Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Otto Braun-Falco

Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis einer Griseofulvinresistenz der Dermatophyten in vivo

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
HILTRUD DYCK
aus Aschaffenburg

MÜNCHEN 1972

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Otto Braun-Falco

Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis einer Griseofulvinresistenz der Dermatophyten in vivo

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
HILTDRUD DYCK
aus Aschaffenburg

MÜNCHEN 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wolf Meinhof
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Otto Braun-Falco
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1972

Herrn Prof. Dr. O. *Braun-Falco* bin ich für den Arbeitsplatz
an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Privat-Doz. Dr. W. *Meinhof*,
der mir das Thema überließ und mich jederzeit beraten und unterstützt hat.

Inhaltsübersicht

Einleitung

Literarischer Teil

I. **Historischer Überblick** Seite

1. Entdeckung des Griseofulvins 7
2. Aufklärung seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften . 8
3. Einführung in die Therapie der Humanmedizin nach erfolgreicher Anwendung im Tierexperiment 8

II. **Das pharmakologische und toxikologische Wirkungsspektrum**

1. Aufnahme, Verteilung und Elimination 10
2. Wirkungsort im Organismus 11
3. Toxizität des Griseofulvins 12
   a) auf Zellkulturen 12
   b) im Tierversuch 12
   c) beim Menschen 13

III. **Therapeutische Anwendung des Griseofulvins in der Humanmedizin**

1. Indikation und klinische Erfahrungen 15
2. Therapeutische Mißerfolge 16
3. Nebenwirkungen der Griseofulvintherapie 16
4. Nichtantibiotische Anwendung des Griseofulvins 18

IV. **Die Griseofulvinwirkung auf die Dermatophyten**

1. Mykomorphologische Veränderungen durch Griseofulvin in Abhängigkeit 19
   a) von der Konzentration des Antibiotikums 19
   b) von der Pilzart 20
2. Mechanismus der antimykotischen Wirksamkeit des Griseofulvins 21
3. Resistente Dermatophyten 22
   a) durch Nährbodenpassagen mit steigendem Griseofulvingehalt 22
   b) durch Tierpassagen 22
   c) beim Menschen 23

Eigene Untersuchungen Seite

I. **Das Untersuchungsmaterial**

1. Gewinnung des Direktmaterials 25
2. Vorbereitung des pilzverdächtigen Materials 25

II. **Methodik**

1. Der Nährboden und die Griseofulvinverdünnungsreihe . . . 26
2. Methodik einer Vorversuchsserie 27
3. Methodik der Untersuchungen zum Nachweis einer Griseofulvin-Adaptation der Dermatophyten in vivo 28
4. Methodik eines Reinigungsversuchs des Direktmaterials von Schimmelpilzsporen 30
5. Methodik eines „vereinfachten Verfahrens zur schnellen in-vitro-Bestimmung der Griseofulvinresistenz von Dermatophyten" nach *Dittmar* (35) 32

III. **Versuchsergebnisse**

1. Ergebnisse eines Reinigungsversuches des Direktmaterials von Schimmelpilzsporen 34
2. Auskeimungszeit aus dem Patientenmaterial auf der Kontrollkultur 35
3. Identifizierung der isolierten Dermatophyten 36
4. Auskeimungszeiten auf Nährböden mit verschiedenen Griseofulvinkonzentrationen 38
5. Mikromorphologische Veränderungen der Dermatophyten durch Griseofulvin in Abhängigkeit von
   a) der Konzentration 38
   b) der Einwirkungsdauer 43
   c) der Pilzart 46
6. Ergebnisse des „vereinfachten Verfahrens zur schnellen in-vitro-Bestimmung der Griseofulvinresistenz von Dermatophyten" nach *Dittmar* (35) 48
7. Dermatophytenwachstum aus dem Untersuchungsmaterial griseofulvinbehandelter Patienten 49

IV. **Diskussion** 50

V. **Zusammenfassung** 53

Lebenslauf 55

Literaturverzeichnis 57

EINLEITUNG

Griseofulvin ist auch heute noch, nachdem es schon mehr als ein Jahr im Handel ist, das einzige praktisch anwendbare, innerlich zu verabreichende Antibiotikum für die Behandlung von Dermatophyten-Infektionen. Neben den meist guten Heilungserfolgen verlangen deshalb gerade therapeutische Versager nach Erklärungen. Dabei steht die Frage einer Griseofulvinresistenz von Pilzstämmen im Vordergrund.

Denn ebenso wie sich im Bereich der Bakterien Antibiotika-resistente Stämme gebildet haben, so besteht auch bei den Dermatophyten die Möglichkeit, daß sich Pilzstämme entwickeln, die gegen Griseofulvin unempfindlich geworden sind.

Primär gegen Griseofulvin resistente Dermatophytenstämme sind nur sehr vereinzelt beschrieben worden. Dagegen ist bekannt, daß sich Dermatophyten an Griseofulvin in vivo adaptieren lassen. Diese Adaptation hält so lange an, wie der Dermatophyt Kontakt mit einem griseofulvinhaltigen Nährmedium hat und verschwindet entweder schon nach der ersten Subkultur oder nach ein bis zwei weiteren Passagen auf griseofulvinfreien Nährböden.

Es ist denkbar, daß bei griseofulvinbehandelten Patienten auch in vivo eine Gewöhnung der Dermatophyten auftritt, die für einen verzögerten Heilungsverlauf verantwortlich sein könnte. Durch die herkömmlichen Methoden der Resistenztestung ist allerdings eine derartige Gewöhnung in vivo wegen ihres passageren Charakters kaum zu eruieren.

Deshab versuchten wir eine neue Testmethode zu entwickeln, die es gestattet, eine eventuelle in vivo eingetretene Adaptation der Pilze anhand von mikromorphologischen Kriterien des aus dem Untersuchungsmaterial auskeimenden Mycels festzustellen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0091

I. Historischer Überblick

1. *Die Entdeckung des Griseofulvins*

Von *Oxford, Raistrick* und *Simonart* (101) wurde bei Untersuchungen über die Biochemie der Mikroorganismen das Griseofulvin 1939 erstmalig als Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes Penicillium grisofulvum *Diercks* isoliert. Seine Wirksamkeit als Antibiotikum erkannte man damals jedoch noch nicht.

1946 publizierten *Brian, Curtis* und *Hemming* (21), daß ein Stoffwechselprodukt eines anderen Schimmelpilzes (Penicillium janczewskii Zal.) auf das Mycel der Grauschimmelfäule der Zwiebeln (Bortytis allii) einen wellenden und bei steigenden Konzentrationen im Nährmedium einen verkrüppelnden Effekt ausübe, der bis zur völligen Verstümmelung der Hyphen führte. Nach der lockenartigen Verdrehung des Mycels, die er bewirkte, bezeichneten sie diesen Wirkstoff als „curling factor".

Ein Jahr später wiesen *Grove* und *McGovan* (64) nach, daß Griseofulvin und der „curling factor" identisch sind.

1949 entdeckte dann *Brian* (20) bei Untersuchungen über die biologische Aktivität von Griseofulvin, daß dieses die gleichen morphologischen Veränderungen der Pilzhyphen bewirkt wie der früher gefundene „curling factor".

Der Schweregrad der Veränderung stand dabei in einem direkten Verhältnis zur Griseofulvinkonzentration im Nährboden. Konzentrationen von 0,2 bis 0,1 µg/ml riefen den „curling effect" hervor in Form von lockenartiger Verdrehung der Hyphen. Bei 1 µg/ml war das Mycel außerdem verdickt, abnorm angeschwollen und viel stärker verzweigt als üblich. Konzentrationen von 10 bis 20 µg/ml schließlich ließen nur noch mißgebildete, vertsümmelte Hyphen entstehen. Bei diesen Versuchen verwendete *Brian* Ascomyceten, Basidiomyceten, Fungi imperfecti und den schon erwähnten Pilz Botrytis allii.

Interessant war, daß trotz dieser starken morphologischen Veränderungen die Konidien nicht in ihrer Auskeimung gehemmt wurden. Nach anschließender Überimpfung auf griseofulvinfreie Nährböden entwickelten sich normale Pilzformen.

Die Identität von Griseofulvin und dem „curling factor" konnten 1949 *Brian, Curtis* und *Hemming* (22) bestätigen. Außerdem isolierten später verschiedene Autoren (23, 75) aus anderen Penicilliumarten (P. nigricans, P. urticae, P. raistrickii) auch Griseofulvin.

2. *Aufklärung der physikalischen und chemischen Eigenschaften*

1951—1952 gelang es *Grove, Ismay, McMillan, Nullholland* und *Rogers* (63) die chemische Struktur des Griseofulvins zu bestimmen, nachdem die Summenformel $C_{17}H_{17}O_6Cl$ schon 1939 (101) aufgestellt worden war. Es handelt sich um ein 7-Chlor-4,6-dimethoxy-cumaran-3-on2 spiro-1′- (2-methoxy-6′methylcyclohex-2′-en-4′on).

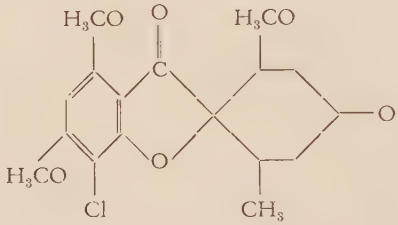

Abb. 1: Griseofulvin.

Griseofulvin ist ein weißes, geschmack- und geruchloses Pulver. Es ist thermostabil. Sein Schmelzpunkt liegt zwischen 218 und 220 Grad Celsius. Es ist stark rechtsdrehend mit einem Molekulargewicht von 309 (101). Die Absorptionsmaxima liegen bei 286 und 325 μm. Durch Sublimation wird ein hoher Reinheitsgrad erreicht. In Wasser ist Griseofulvin schwer löslich. 40 μg/ml lösen sich bei 20° C von normalem Griseofulvin (53, 89, 101, 112), von Griseofulvin mikrofein 120 μg/ml (Fa. Hoechst) in Wasser. In wässeriger Lösung ist Griseofulvin stabil. 12—14 % beträgt die Löslichkeit in Dimethylformamid. Außerdem löst sich Griseofulvin in Eisessig, Benzol, Äther, Äthylalkohol und Dioxan (112); es ist aber schwer löslich in Chloroform, Athylacetat, Toluol und Ligroin. Die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln schwankt zwischen 1 und 12 %.

Brossi und Mitarb. (25) und *Kyburz, Geleick, Frey* und *Brossi* (80) gelang 1960 die Herstellung von synthetischem Griseofulvin. Dadurch wurde es möglich, die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Aktivität und die antimykotische Wirksamkeit von natürlichem Griseofulvin, dem synthetischen Racemat und dessen optischer Antipoden zu vergleichen.

In vitro und beim Meerschweinchen zeigte synthetisches, racemisches epi-Griseofulvin keine antimykotische Wirksamkeit. Dagegen wirkt synthetisches, racemisches Griseofulvin gleich stark wie das natürliche. Die Griseofulvinaktivität hinsichtlich der Stereochemie ist also strukturspezifisch, nicht aber in Bezug auf die optische Konfiguration (46).

3. *Einführung in die Therapie der Humanmedizin nach erfolgreicher Anwendung im Tierexperiment*

Die fungistatische Wirkung des Griseofulvins ist bereits seit längerer Zeit bekannt. Ehe im Jahre 1958 mit der Anwendung des Griseofulvins im Tierexperiment begonnen wurde, bemühte man sich in den vorhergehenden Jahren, etwas über seine

Wirkung auf phytopathogene Pilze zu erfahren (24). Der erwartete große Erfolg bei der Behandlung pilzbedingter Pflanzenkrankheiten blieb jedoch aus. Zwar ist Griseofulvin für viele Pflanzen nicht giftig — es wird von den Wurzeln aufgenommen und als systemisches Antibiotikum in den oberflächlichen Zellschichten verteilt (137) — die Empfindlichkeit der pflanzenpathogenen Pilze jedoch zeigt eine große Variationsbreite.

Nach diesen Untersuchungen mußte auch die von *Brian* (20) 1944 geäußerte Ansicht, daß Griseofulvin nur gegen Pilze, die eine Chitinzellwand aufweisen, nicht aber gegen solche mit Zellulosezellwänden wirksam sei, revidiert werden (93).

Über Erfolge mit Griseofulvin im Tierversuch berichtete 1958 *Gentles* (50) als erster. Er behandelte Meerschweinchen, die mit Mikrosporum canis oder Trichophyten mentagophytes infiziert worden waren, 10 Tage nach der Infektion — zu einem Zeitpunkt also, da sich schon deutlich entzündliche und unter Woodlicht fluoreszierende Herde gebildet hatten — peroral mit 60 µg/ml Körpergewicht Griseofulvin. Danach war bereits innerhalb von 4 Tagen eine Besserung des Krankheitsbildes festzustellen. Die sonst hochgradig entzündliche Reaktion blieb aus, und nach einer Woche waren alle Haarfollikel wieder pilzfrei.

An Hand mikroskopischer Untersuchungen konnte *Gentles* zeigen, daß der unter der Griseofulvinbehandlung nachgewachsene Teil des Haarschaftes frei von Pilzen war, und nur noch die Haarspitze unter Woodlicht fluoreszierte. Erfolge im Tierexperiment veröffentlichten zur selben Zeit auch *Lauder* und *O'Sullivan* (83), *Martin* (87), *Geleick* und *Frey* (47) sowie *Kaplan* und *Ajello* (78), die die Befunde *Gentles* bestätigten.

In die Therapie der Humanmedizin wurde das Griseofulvin 1958 eingeführt. In diesem Jahr berichtete *Riehl* (111) der österreichischen Dermatologischen Gesellschaft über Behandlungsergebnisse, die er nach Aufforderung der englischen Firma *Glaxo Laboratories* Ltd., Griseofulvin am Menschen auszuprobieren, erzielt hatte.

Nach Dosen von 2 bis 3 g/die, die nach ein bis zwei Wochen auf 1 g/die herabgesetzt wurden, sah *Riehl* innerhalb weniger Tage eine Heilung bei Mykosen der behaarten und nicht behaarten Haut. Pathologische Veränderungen des Blutbildes, der Leberfunktion, des Harnstoffes im Serum und der Blutsenkungsgeschwindigkeit konnte er während der Griseofulvintherapie nicht feststellen.

Im gleichen Jahr publizierten Behandlungserfolge beim Menschen *Williams, Marten* und *Sarkany* (137) in England, *Blank* und *Roth* (16) in den USA und *Latapi* (82) in Mexiko. Geheilt oder klinisch wesentlich gebessert werden konnten nach diesen Veröffentlichungen Trichophyton rubrum-Infektionen der Haut und Nägel, Tinea capitis durch Mikrosporum Audouinii, Trichophyton Schönleinii oder Trichophyton violaceum.

1959 kam das Griseofulvin schließlich allgemein als Antibiotikum in den Handel. Publikationen über positive Therapieergebnisse häuften sich. Chemische und physikalische Eigenheiten sowie Nebenwirkungen als auch toxische Reaktionen wurden eingehend untersucht, und man bemühte sich, genaueres über den Aktionsmodus und das Schicksal des Griseofulvins im Organismus zu erfahren.

II. Das pharmakologische und toxikologische Wirkungsspektrum

1. *Aufnahme, Verteilung und Elimination des Griseofulvins im menschlichen Organismus*

Die Resorption des Griseofulvins im Magen-Darm-Trakt beruht auf dem physikalischen Prozeß der Diffusion. Sie ist jedoch begrenzt. Am größten ist die Resorptionsgeschwindigkeit im Duodenum, geringer im Jejunum, Ileum, Magen und Rektum. Im Colon wird kein Griseofulvin resorbiert (8).

Wegen der Lipoidlöslichkeit des Griseofulvins steigert eine umfangreiche Fettmahlzeit die Resorption, wie *Crounse* (32), *Ettig* (38), *Greco, Moss* und *Foley* (58), nachweisen konnten. Die gute Fettlöslichkeit bewirkt auch, daß die Griseofulvinkonzentration im Vollblut doppelt so hoch ist wie im Serum, in dem die Erythrozyten mit ihren stark lipoidhaltigen Zellwänden fehlen (127).

Nach Untersuchungen von *Bedford* und Mitarb. (8) sowie von *Robinson* und Mitarb. (116) verschwindet intravenös injiziertes Griseofulvin sehr rasch aus dem strömenden Blut und verteilt sich regelmäßig in allen Geweben. Lediglich in Haut und Lunge (8), nach oraler Applikation in Leber, Haut, Skelettmuskel und Fettgewebe (116) wird es stärker angereichert. Daß Griseofulvin die Plazentarschranke nicht durchdringt, stellten *Vanbreuseghem* und *Rosenthal* (133) im Tierversuch fest.

Der höchste Blutspiegelwert wird etwa sechs Stunden nach oraler Einnahme erreicht, wie McNall (92, 93) mit Tritium-markiertem Griseofulvin nachweisen konnte. Die Höhe des Blutspiegels ist jedoch nicht proportional der aufgenommenen Dosis, sondern steigt mit höheren Dosen weniger an.

Ein fast konstanter, nur langsam abfallender Blutspiegel, der der zugeführten Dosis proportional ist, besteht zwischen der 10. und 24. Stunde nach Aufnahme. Dieser lang anhaltende für die Therapie wichtige Griseofulvinspiegel wurde auch von *Busfield* und Mitarb. (29) bestätigt. Er hatte ihn mit einer spektrophotofluorometrischen Methode (9) ermittelt.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde festgestellt, daß es keine geschlechtsbedingten Unterschiede in der Höhe des Griseofulvinblutspiegels gibt. Lediglich im Tierexperiment zeigten männliche Ratten eine niedrigere Serumkonzentration als weibliche, sowohl nach oraler, intravenöser, subkutaner und intraperitonealer Gabe des Griseofulvins. Die Ursache dafür liegt im langsameren Abbau durch die Leber bei weiblichen Ratten.

Auch der menschliche Organismus baut Griseofulvin durch Demethylierung in der Leber ab (8). Niere, Milz und Lunge spielen bei der Elimination keine Rolle. Mit dem Urin wird zum Beispiel nur weniger als 1 % ausgeschieden, und zwar als 6-Demethyl-griseofulvin (7).

Die Beobachtung von *Busfield* und Mitarb. (27), daß der Serumgriseofulvinspiegel bei Einnahme von Phenobarbital sinkt, steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Leberausscheidung, die von Phenobarbital beeinflußt wird. Enzymsysteme in den Lebermikrosomen, die am Abbau von Stoffen durch oxydative Demethylierung beteiligt sind, ebenso die Cytochrom-c-Reduktase werden durch Phenobarbital aktiviert (100). *Orrenius* und Mitarb. (100) beschrieben nach Phenobarbitalgaben eine Vermehrung von Enzymen in Mikrosomen der Rattenleber, die durch oxydative Demethylierung die Griseofulvinelimination beschleunigen.

2. *Wirkungsort im Organismus*

Griseofulvin vermag in das Keratin des Deckepithels einzudringen, wie von *Roth jr.* und *Blank* (120) nachgewiesen werden konnte. Die Autoren stellten den Zeitpunkt fest, zu dem beim Menschen Griseofulvin in der untersten Schicht des Stratum corneum erscheint und untersuchten den anschließenden Transport zur Hautoberfläche. Wurden die oberen Hautschichten nach der „Strippingmethode" nacheinander abgerissen und auf die jeweils neu entstandene Oberfläche Makrokonidien von Mikrosporum gypseum gebracht, konnte durch Wachstumshemmung des Dermatophyten die Anwesenheit von Griseofulvin nachgewiesen werden.

Zwei bis drei Tage nach Einnahme des Antibiotikums sah man in der untersten Hornschichtlage in Höhe des Stratum lucidum einen Griseofulvineffekt. Zwölf bis neunzehn Tage dauerte es, bis die halbe Hornschicht von Griseofulvin durchdrungen war. Die Wirkung an der Oberfläche war auch noch nach mehr als einem Monat unsicher.

Die Bedingungen, unter denen Griseofulvin in das Keratin der Haare eingelagert wird, sind etwas günstiger. Schon 1959 stellten *Gentles* und Mitarb. (51) fest, daß die unteren Haarteile, die unter der Griseofulvintherapie nachwachsen, gegenüber den oberen pilzfrei sind. Dies wurde in paralellen Untersuchungen sowohl von *Heite* und *Janke* (65) als auch von *Gentles*, *Barnes* und *Fantes* (51) bestätigt.

Dabei wurden Werte von 5 bis 6 µg Griseofulvin pro g Haar gefunden. Eine Konzentration also, die weit über derjenigen liegt, die in vitro eine völlige Wachstumswachstum von Trichophyton mentagophytes bewirkt. Außerdem zeigte sich, daß 50 % des in den Haaren enthaltenen Griseofulvins wasserlöslich und 50 % durch Methanol extrahierbar sind. Dabei ist der erste Anteil derjenige, welcher der Oberfläche des Haarschaftes anhaftet, der zweite wird in die Hornschicht eingelagert. Der wasserlösliche Teil des Griseofulvins ist somit auswaschbar und kann sich als Wirkungsverlust bemerkbar machen. Das gilt auch für das Keratin des oben besprochenen Deckepithels. So läßt sich erklären, daß bei einer Epidermophytie auf dem Boden einer Hyperhidrosis die therapeutische Wirkung des Griseofulvins geringer ist (65, 66).

Wie die klinischen Erfahrungen bestätigt haben, findet Griseofulvin bei Pilzerkrankungen der Haare (Mikrosporie, Favus, follikulären Trichophytien) weitaus bessere Wirkungsbedingungen als bei Erkrankungen des Deckepithels. Deshalb sollten die Epidermophytien, bei denen die Wirksamkeit wesentlich schlechter ist, nicht nur mit Griseofulvin behandelt werden, da eine lokale Therapie dort besser wirkt. Umgekehrt ist Griseofulvin in der Tiefe der Hornschicht jeder lokalen Therapie überlegen (66).

3. *Toxizität des Griseofulvins*

a) *auf Zellkulturen*

Griseofulvin ist ein Mitosegift. Es hemmt die Mitose aller schnell wachsenden Gewebe wie Colchizin, mit dem es eine Strukturähnlichkeit hat, in der Metaphase (102).

Stanka und *Nasemann* (126) fanden nach 48 Stunden eine Mitosehemmung bei Hela-Zellkulturen, die in Nährmedien mit 10 µg/ml Griseofulvin wuchsen. Diese Zellkulturen zeigten keine Ana- und Telophasen mehr und ihre Chromosomen waren unregelmäßig gruppiert. Wurde Griseofulvin aber im Nährmedium weggelassen, wuchsen sie wieder normal.

Bei Versuchen an Fibroblasten aus Hühnerembryonen konnte *Albrecht* (2) ebenfalls die mitosehemmende Wirkung des Grisefulvins zeigen. Auch diese Zellschädigung war konzentrationsabhängig. Eine Beziehung zwischen der Griseofulvinkonzentration und dem Grad der Mitosestörung bei jungen Geweben stellte *Heymer* (68) 1962 bei Untersuchungen mit Vicia faba, der Pferdebohne fest. Ebenso fand sie geringere Chromosomenschäden, wenn Griseofulvin in stärkerer Verdünnung zugesetzt wurde. *Heymer* untersuchte nur die Mitosen im Stadium der Anaphase. Sie sah dabei Verklebungen und Brückenbildungen, die nicht nur von Schädigungen der Spindel, sondern auch der Chromosomensubstanz herrührten. Bei diesen Versuchen wurden Griseofulvinkonzentrationen verwendet, die den therapeutischen Dosen beim Menschen entsprechen. Natürlich lassen sich trotzdem diese bei Vicia faba gefundenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das Verhalten menschlicher Zellen übertragen.

b) *im Tierversuch*

Im Tierversuch zeigte Griseofulvin bei intravenöser Verabreichung eine toxische Wirkung auf das Knochenmark, den Magen-Darm-Trakt und die Spermiogenese. Die Wirkungen durch Mitosehemmung stellten 1958 zuerst *Paget* und *Walpole* (102) fest. Verabreichten sie Ratten 100 mg Griseofulvin pro kg Körpergewicht intravenös, so kam es schon nach 6 Stunden zu einer Hemmung der Metaphase im Knochenmark, den Keimdrüsen und auch in Transplantationstumoren. Das Allgemeinbefinden schien dabei nicht beeinträchtigt zu sein. Auch erholten sich die betreffenden Gewebe in 24 Stunden. Nur die Spermiogenese war noch 10 Tage lang erkennbar gestört.

Diese Veränderungen sahen *Schwarz* und *Loutzenhiser* 1960 (124) erst bei einer Dosis von 1 g pro kg Körpergewicht. Sie bemerkten bei jungen Mäusen auch eine allgemeine Wachstumshemmung. Paradoxerweise bewirkten kleinere Dosen eine

Gewichtssteigerung und begünstigten die normale Entwicklung. Eine Erklärung für diesen Befund fand man nicht.

Orale Griseofulvingabe oder eine Dosis, die derjenigen beim Menschen entspricht, führt im Tierexperiment zu anderen Ergebnissen.

Schirren (123) gab Ratten mittels Schlundsonde täglich eine Griseofulvinsuspension von 1,5 mg pro 100 g Körpergewicht. Nach drei Tagen traten bei den Tieren Unruhe, Appetitlosigkeit und Durchfälle auf. Diese Symptome verschwanden später wieder. *Schirren* fand keinen Anhalt für eine Schädigung der Spermiogenese bei Ratten. Auch bei hohen, über ein ganzes Jahr täglich oral applizierten Dosen von 50 bis 600 mg pro kg Körpergewicht, sahen *Riehl, Hekele* und *Lofferer* (110) keine toxischen Nebenwirkungen bei Ratten.

Im Tierversuch läßt sich auch eine schädigende Griseofulvinwirkung auf die Leber und den Porphyrinstoffwechsel zeigen. Verschiedene Autoren (5, 15, 105, 135) sahen nach großen Griseofulvinmengen bei Mäusen eine Hepatomegalie und das pathologisch-histologische Bild einer toxischen Hepatitis. Nach Absetzen des Antibiotikums bildeten sich diese Veränderungen wieder zurück.

Bei Mäusen konnte mit einer Dosis, die hundertmal größer war als die beim Menschen therapeutisch verwendete, eine massive Ansammlung von Protoporphyrin (33) in der Leber erzeugt werden. In den Faeces traten Protoporphyrin und Koproporphyrin (12) und im Urin vermehrt δ-Aminolävulinsäure (33) auf. Das Knochenmark fluoreszierte. Auch diese Befunde bei Mäusen waren bei Absetzen des Präparates reversibel.

Es können eine cholostatische (biliäre) Leberzirrhose, gelegentlich sogar Lebertumoren entstehen (135), allerdings nur nach unphysiolgisch hohen Dosierungen. Für diese pathologischen Veränderungen, die auch mit einer vermehrten Eisenaufnahme aber keiner Störung des roten Blutbildes einhergehen, wird als Ursache eine abnorme Porphyrinsynthese in der Leber vermutet.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen in einer neueren Arbeit *Lochhead, Dagg* und *Goldberg* (86). Wenn sie Mäusen zur Nahrung 1,25 beziehungsweise 2,5 % Griseofulvin gaben, konnten sie außer den oben geschilderten Veränderungen auch einen Anstieg der ALA-Dehydratase und einen Abfall der Hämsynthetase in der Leber als Zeichen der Griseofulvinintoxikation der Tiere sehen.

c) *Toxizität des Griseofulvins beim Menschen*

Nach diesen Befunden im Tierexperiment fehlte es nicht an Untersuchungen über die Toxizität therapeutischer Griseofulvindosen beim Menschen, die sehr viel geringer ist als nach den Tierversuchen anfangs vermutet wurde.

Riehl (111) konnte 1959 keine toxischen Nebenwirkungen in Form von Störungen des Blutbildes, der Leber- und Nierenfunktion feststellen. Dies bestätigten 1960 *Livingood* und Mitarb. (85), die 41 Patienten beobachteten, welche täglich 4 × 250 mg Griseofulvin über zehn Wochen bis sieben Monate erhalten hatten. Sie testeten die Leberfunktion und prüften bei zwölf Patienten auch Knochenmarkspunktate.

Einen unterschiedlich großen Leukozytenabfall bei 85% der behandelten Patienten fanden dagegen *McCuistion, Lawlis* und *Gonzales* (88).

Daß diese Veränderung des peripheren Blutes manchmal nachweisbar ist, wurde auch von anderen Autoren beschrieben (103, 116). Mit einer gelegentlichen Depression der weißen Blutbildung — vor allem bei einem vorgeschädigten Knochenmark — muß also bei der Griseofulvintherapie gerechnet werden.

Sorgfältige spermiologische Prüfungen während einer Griseofulvintherapie sollten den Einfluß des Antibiotikums auf das menschliche Samenepithel klären.

McLeod und *Nelson* (90, 91) fanden dabei keine Änderungen der Ejakulatmenge, der Gesamtspermienzahl und der Zahl der Fehlformen. Dagegen kann ein schon vorgeschädigtes Samenepithel eventuell durch Griseofulvin im Sinne einer Verschlechterung beeinträchtigt werden.

Die im Tierexperiment gefundene Beeinflussung des Porphyrinstoffwechsels mußten 1964 *Redecker* und Mitarb. (108) beim Menschen bestätigen. Akute, intermittierende Porphyrien können während einer Griseofulvintherapie exazerbieren. Fälle von akuten Porphyrien wurden auch von anderen Autoren (10, 15) publiziert.

Anläßlich der VII. wissenschaftlichen Tagung der deutschsprachigen Mykologen am 21. 6. 1969 in Krefeld wurde eine Entschließung darüber gefaßt, wann eine Griseofulvintherapie kontraindiziert ist (59).

Darin wird zwar betont, daß trotz hochdosierter und mehrjähriger Anwendung von Griseofulvin beim Menschen keine Lebertumoren und Fruchtschädigungen zu beobachten waren. Auch die unter wesentlich anderen Bedingungen (hohe Dosierung, andere Applikationsarten) gewonnenen tierexperimentellen Ergebnisse sind nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen. Aber aus Gründen der Vorsicht wird empfohlen, eine Griseofulvinanwendung bei Kinderwunsch, Frühschwangerschaft, Störungen des Porphyrinstoffwechsels und schweren Leberschäden zu unterlassen.

III. Therapeutische Anwendung des Griseofulvins in der Humanmedizin

1. *Indikation und klinische Erfahrungen*

Seit den ersten Berichten in den Jahren 1958 und 1959 hat sich Griseofulvin als orales Antimykotikum bei der Behandlung der Mykosen der Haut und deren Anhangsgebilde, die durch eine rein lokale Therapie nicht zu beherrschen sind, einen festen Platz erobert. Es ist wirksam bei der Epidermophytie, der Trichophytie, der Mikrosporie und beim Favus, also nur gegenüber Dermatophyten, während Infektionen durch Candida-Arten und Bakterien, ebenso wie die Histoplasmose, Cryptococcose, Aktinomykose, Sporotrichose, Pityriasis versicolor und die Coccidioidomykose unbeeinflußt bleiben.

Die oberflächliche Trichophytie stellt nach *Immel* und *P. Schmidt* (73) eine absolute Indikation für die Griseofulvinbehandlung dar. Diese Autoren sahen schon nach drei bis dreieinhalb Wochen eine weitgehende Abheilung und bekamen negative Pilzkulturen. Ein Rückgang der Schwellung und der Schmerzhaftigkeit, sowie die Verhinderung der Ausbreitung sind bei Trichophytia superficialis beziehungsweise profunda immer wieder beschrieben worden. Allerdings differieren die Angaben über die Behandlungsdauer von 3 Wochen bis zu 3 Monaten (20, 111).

Die durch Mikrosporum Audouinii und Mikrosporum canis hervorgerufene Mikrosporie läßt sich mit Griseofulvin ebenfalls heilen. Die befallenen Haare zeigen bereits nach wenigen Wochen unter Woodlicht keine Fluoreszenz mehr, und auch die Pilzkultur wird negativ (104, 131). Die Behandlungsdauer sollte sich bei jeder Griseofulvintherapie nach dem Ergebnis einer Kulturkontrolle richten. Mykologische Untersuchungen während der Behandlung helfen auch Rezidive zu vermeiden (96).

Etwas schwieriger ist die Therapie der Onychomykosen. Über die Behandlungsdauer werden unterschiedliche Angaben gemacht. Da die orale Griseofulvinbehandlung langdauernd und in diesem Fall nicht immer sehr überzeugend ist, wird bei Onychomykosen empfohlen, zusätzlich die Nägel zu extrahieren (109, 110) und nach sorgfältiger Nagelbettoilette eventuell auch lokal antimykotisch zu behandeln (128). Gute Erfolge bei einer langfristigen, kontinuierlich durchgeführten Therapie ohne Nagelextraktionen sind aber ebenfalls bekannt (95).

Erfolgreich kann auch die Epidermophytia manuum et pedum mit Griseofulvin angegangen werden. *Roth* und *Blank* (120) schlagen jedoch auf Grund ihrer Unter-

suchungsergebnisse über den Griseofulvintransport durch die Schichten der Haut vor, die oberflächlichen, nicht haargebundenen Dermatomykosen mit den üblichen lokalen Antimykotika zu behandeln. Sie führen meist ebenso schnell wie Griseofulvin zur Heilung.

Beim Favus wird Griseofulvin mit sehr guten Ergebnissen angewendet, wie aus vielen Publikationen über klinische Erfahrungen mit dem Medikament zu entnehmen ist (138).

Seit der Einführung des Griseofulvins in die Behandlung der humanen Dermatophytien wurde auch eine externe Griseofulvinbehandlung wiederholt erwogen. *Grimmer* (62) bemerkte bereits 1960, daß eine lokale Griseofulvinbehandlung grundsätzlich möglich ist, ein derartiges Präparat aber noch nicht zur Verfügung stehe. Nach *Janke* (74) sollen griseofulvinhaltige Salben bei Interdigitalmykosen Therapieerfolge mit geringeren Kosten ermöglichen. In jüngerer Zeit haben *Friedrich* und Mitarb. (48), sowie *Sturm* (129), *Hewitt* und Mitarb. (67) und *Pöhler* (106) über ausgezeichnete Erfolge mit griseofulvinhaltigen Salben berichtet.

2. *Therapeutische Mißerfolge*

Außer der diskutierten Griseofulvinresistenz sind sehr oft individuelle Faktoren des Patienten für therapeutische Mißerfolge verantwortlich. So können eine ungenügende Resorption des Griseofulvins, gestörtes Nagelwachstum oder schlechte Durchblutungsverhältnisse am Krankheitsherd an einer unzureichenden Therapie schuld sein.

Für das Therapieversagen vor eindeutiger Diagnosestellung an Hand des Nativpräparates und der Kultur nennt *Rieth* (114) folgende Ursachen:
griseofulvinunempfindliche Pilze als alleinige Erreger; Mischinfektionen, wobei die griseofulvinunempfindlichen Hefen oder Schimmelpilze nicht zusätzlich behandelt wurden und einen Erregerwechsel unter der Behandlung.

Therapieresistenz bei Onychomykosen begründet *Grimmer* (60, 61) auch mit der besonderen anatomischen und physiologischen Nagelbeschaffenheit. Er weist auf die Bedeutung der Histopathologie der Onychomykosen für den Heilungsablauf hin. Die schnell wachsende Nagelplatte schiebt sich während der Griseofulvinbehandlung über das noch pilzbefallene subunguale, hyperkeratotische Gewebe. Dieses „Gletscherprinzip" des Nagelwachstums kann dazu führen, daß mykotische Herde unter der Nagelplatte persistieren.

Polemann (107) bezeichnete eine Nagelplatte, die durch einen flachen Hohlraum getrennt ein noch ganz von Pilzen bedecktes Nagelbett verdeckt, als „Attrappennagel". Diese Pilznester sind oft von der Blutversorgung abgetrennt und können die Ursache für das Versagen des Griseofulvins sein.

3. *Nebenwirkungen der Griseofulvintherapie*

Bei den üblichen Dosierungen von 1 bis 2 g bzw. 0,5 bis 1,0 g (mikrofein) täglich sind Nebenwirkungen beim Menschen selten und zwingen meist nicht zu einer Unterbrechung der Griseofulvintherapie.

Die am häufigsten beschriebenen Nebenerscheinungen sind Kopfschmerzen und Störungen von Seiten des Magen-Darm-Traktes, die sich durch Übelkeit, Völlegefühl, Appetitlosigkeit und leichte Durchfälle bemerkbar machen.

Meinhof (95) und *Tappeiner* (130) beobachteten auch Muskelschmerzen. Eine Erklärung für diesen Befund geben *Schäfer* und Mitarb. (122), die an Hand von Serumuntersuchungen bei wegen Mikrosporie unter Griseofulvinbehandlung stehenden Kindern feststellten, daß die Serumfermente Veränderungen zeigten, die für eine leichte Permeabilitätsstörung der Muskelzellen sprechen.

Beim Genuß von nur geringen Alkoholmengen nach Griseofulvineinnahme beschreibt *Meinhof* (95) Benommenheit und Schwindelgefühl. Andere Autoren beobachteten nach Alkoholgenuß auch Orientierungsstörungen, die verhältnismäßig schwerwiegend waren (54).

Häufiger treten Exantheme als Nebenerscheinungen einer Griseofulvintherapie auf. Sie können morbiliform, gelegentlich auch scarlatiniform oder urtikariell sein. *Hoffmann* (69) sah bei der Behandlung der Dermatomykosen mit Griseofulvin in 30% der Fälle Nebenwirkungen in Form von Kopf-, Magenschmerzen und Exanthemen.

Eine zunehmende UV-Licht-Überempfindlichkeit, die zum Heilungseffekt parallel verläuft, beschreibt *Faustova* (39). Photosensibilisierung ihrer Patienten konnten auch *Ettig* (38), *Götz* (54), *Lamb* und Mitarb. (81) und *Blank* (15) feststellen. Diese Patienten reagierten mit akuten Erythemen auf die ultravioletten Sonnenstrahlen, die durch Fensterglas gelangt waren. Griseofulvinunbehandelte zeigten bei der gleichen Strahlendosis nur eine geringfügige Rötung. Der Entstehungsmechanismus dieser Photosensibilisierung ist noch ungeklärt.

Wie *Bessone* (11) berichtet, traten in Italien bei drei Brüdern im Verlauf einer Griseofulvinbehandlung Hyperpigmentierungen an der Raphe penis und an den Brustwarzenareolen auf. Darüber hinaus zeigte sich eine Gynäkomastie, die radiologisch als Gynäkomastia vera bestätigt wurde. Diese Beobachtung unterstreicht andere Literaturberichte von einer durch Griseofulvin ausgelösten Brustdrüsenhyperplasie, wobei jedoch einem konstitutionellen Faktor entscheidende Bedeutung zukommt.

Erwähnenswert sind auch noch vegetative Störungen wie Herzklopfen und Hitzewallungen nach Griseofulvineinnahme (54).

Zu den bei *Fegeler* u. *Forck* (40) als erwünscht genannten Nebenwirkungen zählen die Anregung des Haarwachstums (79) und die Beeinflussung des peripheren Kreislaufs. Die bei Onychomykosen häufig auftretenden arteriellen Gefäßspasmen (13, 42) konnten nämlich unter der Griseofulvinbehandlung gelöst werden.

Die unerwünschten Nebenwirkungen des Griseofulvins sind wie schon erwähnt bei normaler Dosierung selten, reversibel und zwingen meist nicht dazu, das Medikament abzusetzen. Todesfälle wurden während einer Griseofulvintherapie bisher nicht beschrieben.

4. *Nichtantibiotische Anwendung des Griseofulvins*

Nachdem die mitosehemmende Wirkung auf schnell wachsende Gewebe bei Zellkulturen und im Tierversuch nachgewiesen war, versuchte man das Griseofulvin auch als Zytostatikum in der Humanmedizin einzusetzen.

Keinen Einfluß zeigte dabei eine Griseofulvinbehandlung von Dermatomykosen auf gleichzeitig vorhandene Hauttumoren, wie Basaliome oder Melanome (52). Unwirksam war Griseofulvin auch bei einem Behandlungsversuch der Mykosis fungoides. Ein lokaler zytostatischer Effekt auf Hauttumoren bei intrakutaner Injektion fehlt ebenfalls.

Therapeutisch Verwendung fand Griseofulvin aber bei der Gicht. *Slonim* und Mitarb. (125) berichten von guten Erfolgen beim akuten Gichtanfall. Obwohl ihre Patienten 16 g Griseofulvin am Tag erhielten, waren keine toxischen Reaktionen festzustellen. Griseofulvin kann deshalb besonders dann verwendet werden, wenn der Patient Colchizin nicht verträgt. Die Wirksamkeit beider Medikamente beim akuten Gichtanfall — beides sind Mitosegifte — beruht wohl auf ihrer chemischen Strukturähnlichkeit, obwohl ihr Angriffspunkt verschieden ist. Colchizin bewirkt eine Hemmung des Nukleinsäurestoffwechsels, während Griseofulvin als kompetitives Analogon in die DNS-Synthese eingreifen soll (92). Deshalb läßt sich die mitosehemmende Wirkung des Griseofulvins auch durch Purine aufheben.

Eine kombinierte Anwendung von Griseofulvin und Colchizin führte jedoch im Tierversuch zu einer Potenzierung der toxischen Wirkungen (37).

Als gefäßerweiternde Substanz kann Griseofulvin ebenfalls Verwendung finden. Wie schon erwähnt ist dieser Effekt besonders günstig bei den Onychomykosen, die mit peripheren Gefäßspasmen einhergehen. *Forck* und *Fegeler* (44) behandelten drei Patienten mit diffuser Sklerodermie sehr erfolgreich mit Griseofulvin. Das Kältegefühl in den Händen verschwand, oberflächliche therapieresistente Ulzerationen heilten ab, und die Haut wurde wieder weicher.

Eine vermehrte Koronargefäßdurchblutung erzielte *Rubin* (121) im Tierversuch mit Griseofulvin, das er in eine Koronararterie des Hundes injizierte. Derselbe Effekt zeigte sich nach intravenöser Injektion, der auch durch eine Blockade der autonomen Ganglien nicht aufzuheben war. Deshalbt nimmt *Rubin* an, daß Griseofulvin direkt an den Gefäßen angreift, und nicht auf neuralem Weg gefäßerweiternd wirkt.

Kurz nach diesem Tierversuch berichteten andere Autoren (34) von einer erfolgreichen Griseofulvinanwendung bei Patienten mit Angina pectoris.

Schließlich sei noch die Verwendung von Griseofulvin bei einigen rheumatologischen Erkrankungen, wie dem Schulter-Hand-Syndrom und der Periarthritis humeroscapularis erwähnt, von der *Cohen* und Mitarb. (30) berichten.

IV. Die Griseofulvinwirkung auf die Dermatophyten

1. *Mykomorphologische Veränderungen durch Griseofulvin*

a) *in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums*

Die griseofulvinempfindlichen Pilze wachsen schon makroskopisch in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums im Nährboden weit weniger üppig als normal. Durch Messung der radialen Wachstumsrate kann die Hemmung bereits mit bloßem Auge erfaßt werden. Bei der Konzentration von 2 µg/ml ist der Wachstumsradius der Kultur nach Angaben von *Buch* (26), *Böhme, Ziegler* (18) sowie *Brian* (20) nur noch halb so groß wie in der Kontrollkultur. Nahezu kein weiteres Wachstum zeigt ein Pilz bei Konzentrationen von 5 µg/ml im Nährmedium.

Daß Griseofulvin besonders morphologische Veränderungen der Pilzhyphen bewirkt, entdeckte *Brian* (20) schon 1949 bei Untersuchungen über die biologische Aktivität von Griseofulvin. Diese treten meist innerhalb einhalb bis zwei Tagen nach dem Auskeimen auf und sind auch abhängig von der Griseofulvinkonzentration im Nährboden. Die Pilzsporen bleiben allerdings unbeeinflußt. *Blank* und *Roth* (16) sowie *Brian* (19) beschrieben nämlich ein normales Auskeimen und Wachstum von Sporen, die zwei Wochen in einer Griseofulvinlösung gelegen hatten.

Im folgenden sollen die verschiedenen, aber für die jeweilige Griseofulvinkonzentration typischen mikromorphologischen Veränderungen der Dermatophyten beschrieben werden, die lichtmikroskopisch zu erkennen sind.

Ein vermindertes Längenwachstum der Hyphen sieht man bei Konzentrationen bis zu 0,1 µg/ml (3, 26). Dazu tritt bei Konzentrationen zwischen 1—2 µg/ml der „curling effect" auf, das heißt die Hyphen zeigen eine lockenartige Verdrehung, wachsen stark geschlängelt und sind stärker verzweigt als bei normalem Wachstum. Auch wurde eine Änderung der Wachstumsrichtung zum Auskeimungspunkt hin beschrieben.

Höhere Konzentrationen von Griseofulvin als 2 µg/ml Nährboden zeigen die schwerste Störung des Mycels (26). Die Hyphen sind fast völlig verstümmelt, verknäulen sich und schwellen ballonartig an. Schließlich kommt es zum Aufplatzen der Hyphenenden mit Austritt des Protoplasmas (77, 113). Dabei zeigen sich atypische Zellgrößen, und die normalen Zytoplasmastrukturen gehen verloren (3, 14, 115, 119). Die Auftreibungen und das Aufplatzen der Hyphenenden sind nach *Aytoun* (3) die Folge einer enormen Drucksteigerung in der Zelle.

Elektronenmikroskopisch sahen *Blank* und Mitarb. (14) außerdem auch Vakuolenbildungen, das Fehlen von Mitochondrien und Lipoidkörper, die infolge von Zellwanddefekten von einer Zelle in die andere wanderten. Die Integrität der Zellwand des Mycels geht anscheinend unter dem Einfluß von Griseofulvin verloren. Zwar beobachteten diese Autoren einerseits eine Zellwandverdickung, sahen aber andererseits Risse, dort wo sich die Zellwand in ihre Wandlagen aufsplitterte und einen unregelmäßigen Aufbau zeigte. *Blank* und Mitarb. erklären diesen Befund mit der Abtötung junger Zellen durch Griseofulvin, während sie annehmen, daß ältere Zellelemente nicht in demselben Maße angegriffen werden und somit eher überleben.

Ähnliche morphologische Veränderungen an Dermatophyten kann unter anderem auch das häufig bei Experimenten mit Griseofulvin verwendete Lösungsmittel Dimethylformamid in höheren Konzentrationen hervorrufen (26, 115).

b) *in Abhängigkeit von der Pilzart*

Die differente Griseofulvinempfindlichkeit der einzelnen Dermatophyten untersuchte *Götz* (56) an 18 Arten und stellte am 20. Tag nach der Aufimpfung folgende Einteilung auf. Nach seinen Ergebnissen waren

hochgradig empfindlich:
- Mikrosporum Audouinii
- Mikrosporum canis
- Trichophyton verrucosum
- Trichophyton Megninii

gut empfindlich:
- Trichophyton gallinae
- Trichophyton concentricum
- Trichophyton ferrugineum
- Trichophyton soudanense
- Trichophyton violaceum
- Trichophyton rubrum
- Epidermophyton floccosum

und als weniger empfindlich bezeichnete er:
- Mikrosporum gypseum
- Mikrosporum distortum
- Trichophyton mentagrophytes
- Trichophyton Schönleinii
- Trichophyton tonsurans
- Trichophyton quinckeanum
- Trichophyton equinum
- Keratinomyces Ajelloi

Bei seinen Untersuchungen fiel auf, daß geringe Griseofulvinmengen (1 µg/ml) bei bestimmten Pilzarten die Entwicklung verzögerten, eine zweihundertfache Menge im Nährmedium jedoch keine totale, sondern auch nur eine verzögerte Wachstumshemmung zur Folge hatten.

Nach *Buch* (26) treten die morphologischen Veränderungen durch Griseofulvin bei den einzelnen Arten nicht immer in der gleichen Reihenfolge auf. Die Autorin beobachtete bei T. rubrum, daß geringe Griseofulvinkonzentrationen zur Wachstumshemmung, höhere Konzentrationen aber bereits zu Hyphenauftreibungen und Cytoplasmaaustritten führten, ohne daß in einer Zwischenstufe der „curling effect" ausgebildet wurde.

2. *Mechanismus der antimykotischen Wirksamkeit des Griseofulvins*

Die Wirkung des Griseofulvins auf die Dermatophyten ist sowohl fungistatisch als auch fungizid, je nachdem ob ruhende oder wachsende Zellen betroffen sind (15). Der Aktionsmodus ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zwar können alle durch Griseofulvin bedingten Veränderungen als Zellwanddefekte aufgefaßt werden, aber der früher von *Brian* (20) vermutete Mechanismus einer Störung des Chitinaufbaues hat sich nicht bestätigt. Bei einigen Pilzen nämlich fand man trotz chitinhaltiger Zellwände keinen „curling effect" (1, 98), und es werden auch Pilze durch Griseofulvin gehemmt, die Chitin nicht als Zellwandbestandteile besitzen.

Dagegen spricht einiges für eine Störung der DNS-Synthese durch Griseofulvin (15). Griseofulvinempfindliche Pilze zeigen einen verminderten Einbau von C^{14}-Thymidin und C^{14}-Uridin in die Nukleinsäuren (36) und somit eine Verminderung der Fähigkeit Proteine zu synthetisieren, die sie zum Aufbau ihrer Zellwände benötigen.

Das auf griseofulvinhaltigem Nährboden wachsende stark geschädigte vegetative Mycel bildet ein völlig normal wachsendes Luftmycel. Das läßt den Schluß zu, daß das Antibiotikum im Mycel nicht fortgeleitet wird (26).

Gelangt aber ein Luftmycel auf das griseofulvinhaltige Nährmedium, so hört sein normales Wachstum sofort auf. An der Kontaktstelle entstehen dann viele kleine, stark verzweigte und morphologisch veränderte Mycelien, die, falls die Griseofulvinkonzentration und damit die Schädigung nicht zu groß ist, wiederum ein gesundes Luftmycel bilden können. Bei dieser Art der Ausbreitung des Mycels sprechen *Aytoun* und Mitarb. (4) vom „Sprößling-Typ".

Mit Hilfe von Redoxindikatoren untersuchten *Jung* und *Gerhard* (76, 77) die Wirkung des Griseofulvins auf die Aktivität reduzierender Fermentsysteme der Pilze. Bei der Konzentration von 2 µg Griseofulvin pro ml waren bereits keine Fermentreaktionen bei T. rubrum und T. mentagrophytes mehr nachweisbar, während im Vergleich dazu Hefen selbst bei 100 µg/ml keine Schädigung ihrer Fermentsysteme zeigten.

Allerdings erholten sich nach zehn bis vierzehn Tagen die untersuchten Dermatophyten insoweit, daß sie einigermaßen gerade Mycelien bildeten, die wieder positive Fermentreaktionen hatten. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit einer Enzymbildung („Griseofulvinase"), wodurch der Pilz in der Lage sei, Griseofulvin zu entgiften. Beobachtungen von *Boothroyd* und Mitarb. (18) machen wahrscheinlich, daß einige Pilze zum Beispiel Mikrosporum canis in der Lage sind, Griseofulvin durch Demethylierung abzubauen. Auf griseofulvinhaltigem Nährboden wuchsen diese

Pilze anfangs stark gehemmt. Nach einigen Tagen entstand am Rand der Pilzkolonie ein neues ungehindertes Wachstum. Untersuchungen zeigten, daß an dieser Stelle der Nährboden kein Griseofulvin mehr enthielt. Es konnten dort aber unwirksame, nämlich demethylierte Griseofulvinformen nachgewiesen werden. Eine „Griseofulvinase" wurde jedoch nicht gefunden.

In einem gewissen Konzentrationsbereich soll Griseofulvin auch die oxydative Phosphorylierung der Dermatophyten hemmen, *Böhme* und *Ziegler* (18) beobachteten, daß die Phosphataufnahme der Mycelien, die auf griseofulvinfreiem Nährboden in den ersten drei Wochen des Wachstums zunimmt, bei Vorhandensein von Griseofulvin aufhört. Es kann sogar zu einer Phosphatausscheidung kommen, wenn die Griseofulvinkonzentration sehr hoch liegt.

Nach den bisherigen Untersuchungen werden alle Dermatophyten durch Griseofulvin sicher in ihrem Wachstum in vitro gehemmt. Die Grenze der Wachstumshemmung (= minimale Hemmkonzentration) hat nicht nur für die verschiedenen Stämme konzentrationsabhängig unterschiedliche Werte, sondern wird auch noch von anderen Faktoren, wie Beobachtungszeit (31), Temperatur und Beschaffenheit des Nährbodens (49) mitbestimmt.

3. *Resistente Dermatophyten*

a) *durch Nährbodenpassagen mit steigendem Griseofulvingehalt*

Durch mehrmalige Verpflanzung auf Nährböden mit steigender Griseofulvinkonzentration gelang es vielen Untersuchern Dermatophytenstämme zu züchten, die in ihrem Wachstum nicht mehr durch das Antibiotikum gehemmt wurden. Bei dieser Gewöhnung durch Nährbodenpassagen konnte ein Wachstum einzelner Stämme bis zu Konzentrationen von 32 000 µg/ml erreicht werden, wie zum Beispiel bei Trichophyton mentagophytes variatio granulosum et interdigitale, wenn der Zeitraum für die Anpassung lange genug war (132).

Allerdings geht diese Gewöhnung an Griseofulvin immer wieder verloren, sobald die Pilze auf einem griseofulvinfreien Nährboden wachsen. Die Pilze sind dann ebenso empfindlich wie die Ausgangskulturen. Eine Resistenz im Sinne einer Mutation kommt dabei nicht in Betracht (84). Nach *Buch* (26) ist allerdings ein geringer Hemmeffekt über ein bis zwei Passagen auf griseofulvinfreien Nährböden noch nachweisbar.

b) *durch Tierpassagen*

Auch durch fortlaufende Passagen über Versuchstiere konnte eine Griseofulvingewöhnung der Dermatophyten erreicht werden.

Weiße Kaninchen wurden experimentell durch T. mentagophytes var. asteroides infiziert (72). Dieser Dermatophyt zeigte zu Beginn eine minimale Hemmkonzentration von 0,5 µg Griseofulvin pro ml. Im Verlauf von acht Passagen steigerte sich die minimale Hemmkonzentration auf 120 µg/ml.

Das Ergebnis der Experimente war, daß während der Tierpassagen eine immer längere Zeit zur klinischen Heilung der Tiere mit Griseofulvin gebraucht wurde. Während die Kaninchen der ersten Versuchsgruppe schon nach 15 bis 18 Tagen geheilt waren, dauerte es bei der letzten 34 bis 44 Tage.

Pilzstämme, die in vivo wiederholt mit Griseofulvin in Berührung kommen, könnten also durchaus auch in der Lage sein, eine größere Toleranzbreite gegen das Antibiotikum zu entwickeln.

Wurden nun solche nach dem oben erwähnten Versuch griseofulvinempfindlich gewordene Stämme wieder zur Tierinfektion verwendet, so erwiesen sie sich in vivo ebenso empfindlich, wie Stämme, die nicht an Griseofulvin gewöhnt waren (55).

Zu gleichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren (71, 117, 132). Nur *Vidmar-Cvetanovic* und *Jadassohn* (134) berichteten 1967 von einem auf griseofulvinimprägniertem Löschpapier resistent gewordenen Trichophyton quinckeanum-Stamm, der sich auch nach Rückisolierung von einem durch ihn infizierten Meerschweinchen als resistent erwies. Ein Jahr später wurde dieser Stamm wieder unbehandelten Meerschweinchen inoculiert und war nicht mehr pathogen.

c) *griseofulvinresistente Dermatophyten beim Menschen*

Nur wenige Autoren beschrieben bisher eine steigende Griseofulvinadaptation in vitro und in vivo. *Roth* (118) konnte bei 10 von 30 Stämmen, die von therapieresistenten Krankheitsherden gezüchtet wurden, eine verminderte Empfindlichkeit gegen Griseofulvin feststellen. Es handelte sich dabei um Stämme von Mikrosporum canis, Epidermophyten floccosum, Trichophyton rubrum und T. mentagrophytes.

Auch *Fisher* und Mitarb. (43) berichten von einem Patienten, bei dem es während der 18 Monate dauernden Therapie einer Epidermophyton floccosum-Infektion zu einer Gewöhnung der Dermatophyten von 1,7 µg/ml bis zu 8,0 µg Griseofulvin pro ml kam. Eine klinische Heilung wurde in diesem Fall nicht erzielt.

Bei einer Trichophyten tonsurans-Infektion fiel dagegen *Michaelides* und Mitarb. (97) schon zu Beginn der Erkrankung die Therapieresistenz auf. Tatsächlich war hier schon von Anfang an die Griseofulvinempfindlichkeit von normalerweise 7 µg/ml auf 20 µg/ml herabgesetzt.

Auf die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung gegen das Antibiotikum Griseofulvin wird zwar in der Literatur häufig hingewiesen, es liegen aber bisher nur wenige Mitteilungen über den tatsächlichen Nachweis einer Resistenz bei Dermatophyten vor.

Durch Nährbodenpassagen mit steigendem Griseofulvingehalt und auch durch Passagen über griseofulvinbehandelte Tiere konnte eine Empfindlichkeitsabnahme der Dermatophyten in vitro erreicht werden, aber Dermatophyten mit echter Resistenz wurden beim Menschen in vivo selten nachgewiesen.

Der Grund dafür könnten die bisherigen ungeeigneten Testverfahren sein. Danach wird der Pilz zunächst in der Primärkultur isoliert und dann, falls nach dieser ersten griseofulvinfreien Nährbodenpassage Verunreinigungen wie Schimmelpilze oder Bakterienrasen enthalten sind, in Reinkultur gezüchtet. Erst nach dieser zweiten Passage kann der zu untersuchende Pilz den Tests zugeführt werden. Bis dahin ist jedoch nach den bisherigen Erfahrungen die Griseofulvinadaptation verloren gegangen.

Deshalb versuchten wir mit einer direkten Testmethode eine Adaptation der Pilze an das Antibiotikum bei griseofulvinbehandelten Menschen nachzuweisen.

Eigene Untersuchungen

I. Das Untersuchungsmaterial

1. *Gewinnung des Direktmaterials*

Das untersuchte Patientenmaterial bestand aus Haaren, Nagelsubstanzen und Schuppen. Sofern wir das Material selbst vom Patienten abnahmen und nicht das im mykologischen Labor eingegangene untersuchten, wurde der pilzverdächtige Hautbezirk vor Entnahme des Materials mit 70%igem Alkohol gereinigt, um die Verunreinigung durch Bakterien und Schimmelpilze so gering wie möglich zu halten.

Bei der Entnahme gingen wir folgendermaßen vor:

Von den Hautstellen wurden die *Schuppen* am Rand des Herdes mit einem sterilen oder zumindest in der Bunsenbrennerflamme ausgeglühten und abgekühlten Skalpell abgekratzt.

Die *Haare* zupften wir aus den Zentren der pilzverdächtigen Herde mit einer Pinzette aus.

Als *Nagelsubstanzen* gelangten entweder extrahierte Nägel oder mit der Schere abgeschnittene proximale Nagelteile zur Untersuchung. Es wurden hauptsächlich die leicht abkratzbaren, weichen Teile der Nagelunterseite verwendet, die besonders viele Pilze enthalten.

2. *Vorbereitung des pilzverdächtigen Materials*

Bevor wir Haare, Nagelsubstanzen und Hautschuppen aufimpften, zerkleinerten wir sie je nach Beschaffenheit des Materials in millimetergroße Partikelchen.

Dadurch sollte einmal die Gesamtoberfläche, die mit dem Nährboden in Berührung kommt, vergrößert werden, damit sich auch diejenigen Pilze, die tiefer im Material sitzen, sofort auf dem Nährmedium ausbreiten können. Andererseits sollte auf diese Weise eine bessere Durchfeuchtung des Materials auf der Agaroberfläche zustande kommen und somit das Wachstum gefördert werden.

Bei der Zerkleinerung des Materials, wie auch beim Aufimpfen wurden die allgemeinen Forderungen sterilen Arbeitens eingehalten. Das heißt, alle benutzten Instrumente werden vor jedem Arbeitsgang in der Bunsenbrennerflamme ausgeglüht. Dann läßt man sie einige Sekunden lang abkühlen, um die hitzeempfindlichen Pilze nicht zu zerstören. Außerdem muß in einem Raum ohne Luftzug, bei geschlossenen Fenstern und Türen gearbeitet werden, damit Schimmelpilzsporen aus der Luft das Untersuchungsmaterial nicht verunreinigen können.

Eine Vorbehandlung des Materials mit Alkohol erübrigte sich, da dem Nährboden die Antibiotika Colistin und Novobiocin zugesetzt wurden.

II. Methodik

1. *Der Nährboden und die Griseofulvinreihe*

Als Nährboden für alle Versuche benutzten wir den Hamburger Testagar (Grütz-Kimmig-Agar) in der Zusammensetzung:

Glukose	10,0
Pepton	5,0
Glycerin	5,0
NaCl	5,0
Standard-Nährbouillon „Merck"	5,0
Agar-Agar der Fa. Merck pulv.	18,0
Aqua destillata	ad 1000,0

Dieser Agar wurde an drei aufeinander folgenden Tagen je 30 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Erst dann setzten wir ihm Griseofulvin und die Antibiotika zur Hemmung des Bakterienwachstums zu.

In den Vorversuchen verwendeten wir Dimethylformamid in 0,5%iger Lösung als Griseofulvinlösungsmittel. Dieses Lösungsmittel rief aber auch schon bei der Konzentration von 0,5% in der Kontrolle Mycelveränderungen hervor, die den Veränderungen durch Griseofulvin ähnelten.

Wie auch bei *Buch* (26) angegeben, sahen wir bei den meisten Dermatophyten in der Lösungsmittelkontrolle ausgeprägte mikromorphologische Veränderungen, wie den „curling effect" und eine Wachstumshemmung des Mycels. Um diese scheinbaren Griseofulvinwirkungen, die vor allem in den niedrigen Konzentrationen auch durch Dimethylformamid hervorgerufen sein konnten, auszuschließen, verzichteten wir auf Dimethylformamid als Lösungsmittel. Deshalb wurde bei allen Versuchen Griseofulvin in aqua dest. gelöst.

Wir verwendeten Griseofulvin mikrofein (Likuden M der Fa. Hoechst), das eine bessere Löslichkeit als das normale Griseofulvin besitzt. Nach einer persönlichen Mitteilung der Fa. Hoechst lösen sich 12 mg Likuden M in 100 ml aqua dest. unter mehrmaligem Erhitzen und Abkühlen.

Nach der dritten Sterilisation setzten wir dem noch flüssigen, aber weitgehend abgekühlten Hamburger-Test-Agar das gelöste Griseofulvin und zur Hemmung des Bakterienwachstums Colistin 70 µg/ml und Novobiocin 100 µg/ml nach den Angaben von *Götz, Hantschke* und *Valentová* (57) zu.

Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen folgende Griseofulvinkonzentrationen in den Nährböden:

0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg und 6 µg/ml, außerdem eine Kontrolle ohne Griseofulvin.

In Tab. 1 sind die verwendeten Agar- und Substanzmengen für die einzelnen Verdünnungsstufen zusammengestellt.

Tab. 1: Verdünnungsstufen mit Agar- und Substanzmengen.

Konzentration	6 µg/ml	2	1	0,5	0,25	Ko
12 mg/100 ml GF in Aqua dest. 0,012%	2 ml	0,66	0,32	0,16	0,08	
Aqua dest. ml	—	1,34	1,68	1,84	1,92	
Agar ml	38,0	38,0	38,0	38,0	38,0	40,0
Petrischalen	2	2	2	2	2	2

Zeichenerklärung: GF = Griseofulvin Ko = Kontrolle

Beim Gießen der Platten wurde auf größtmögliche Sterilität geachtet und mit der schwächsten Konzentration begonnen, um die im Glaskolben verbleibende Restmenge und somit die Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten.

2. *Methodik einer Vorversuchsserie*

Für die Vorversuche stanzten wir unter sterilen Kautelen in den gegossenen Platten neun Dreiecke nach einem in Abb. 2 wiedergegebenen Schema aus.

Der restliche Agar wurde bis auf die Randsegmente, die für genügend Feuchtigkeit sorgen sollten, entfernt. Nachdem sie mit dem Untersuchungsmaterial beimpft waren, deckten wir die von 1 bis 9 am Plattenboden beschrifteten Dreiecke mit Deckgläschen ab, wie es in Abb. 2 eingezeichnet ist.

Vorteile dieser Methode waren, daß auf weitere Gefäße und feuchte Kammern verzichtet werden konnte. Außerdem bildeten sechs solche Platten mit den verschiedenen Griseofulvinkonzentrationen und einer Kontrolle eine übersichtliche Griseofulvinreihe, auf der neun verschiedene Untersuchungsmaterialien gleichzeitig bebrütet werden konnten.

Als nachteilig erwies sich jedoch bei dieser Methode die erhebliche Verunreinigung durch Anflugssporen, wenn die Petrischalen zur mikroskopischen Betrachtung geöffnet werden mußten. Besonders die freien Nährbodenteile waren bald von Schimmelpilzen überwuchert, so daß eine Beurteilung des Dermatophytenwachstums unmöglich wurde.

Wir gaben deshalb diese Methode nach den Vorversuchen auf und wählten eine andere, die im folgenden beschrieben werden soll.

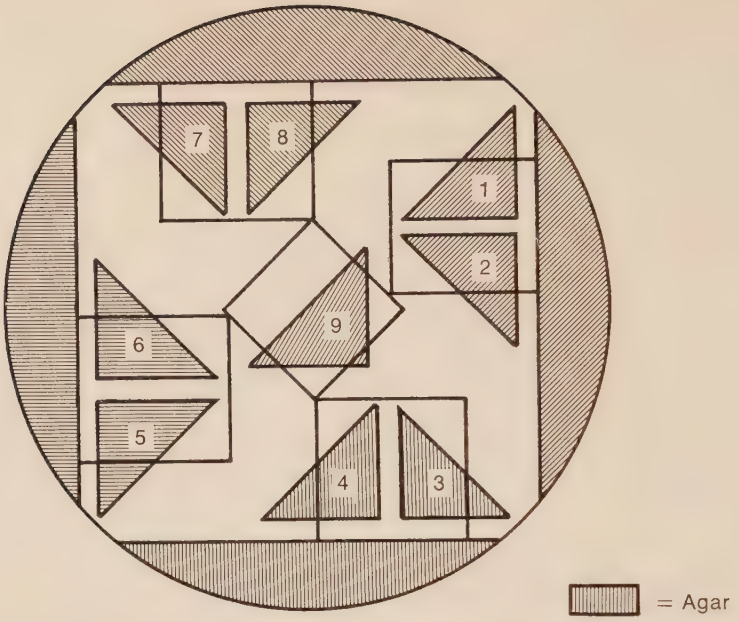

Abb. 2: Muster einer Petrischale, in der neun Agardreiecke ausgestanzt und teilweise mit Deckgläschen abgedeckt sind.

3. *Methodik der Untersuchungen zum Nachweis einer Griseofulvin-Adaptation der Dermatophyten in vivo*

Aus den nach der oben angegebenen Tabelle (Tab. 1) gegossenen, erkalteten Nährbodenplatten, schnitten wir mit einem sterilen Skalpell briefmarkengroße Agarstückchen aus und brachten diese auf Objektträger. Ein Objektträger konnte mit drei Nährbodenstückchen beschickt werden. Diese beimpften wir punktförmig mit dem Untersuchungsmaterial und deckten sie mit Deckgläschen zu.

Obwohl Objektträger und Deckgläschen sterilisiert waren, zogen wir sie vor jedem Arbeitsgang noch einmal kurz durch die Flamme. Es wurde streng darauf geachtet, daß das Arbeitsgerät (Impfösen und -haken) nicht ohne vorheriges Ausglühen mit dem Material mehrerer Patienten in Berührung kam. Wir arbeiteten auch in einem Raum ohne Luftzug, also stets bei geschlossenen Fenstern und Türen.

Aufbewahrt und bebrütet wurden die gekennzeichneten Objektträger in feuchten Kammern. Dazu benutzten wir große sterile Glasschalen, in denen auf Bänken aus gebogenen Glasstäbchen die Objektträger auch gestapelt werden konnten. Für Feuchtigkeit sorgte mit Aqua dest. getränktes Filterpapier am Boden der Kammern. Auch die Glasschalen, Glasstäbe und das Filterpapier wurden, ehe wir sie mit den Objektträgern beschickten, mindestens zwei Stunden im Autoklaven sterilisiert.

Einen einzelnen beimpften Objektträger und die Griseofulvinreihen in einer einzelnen und mehreren feuchten Kammern zeigen die Abb. 3—5.

Abb. 3: Der Objektträger ist mit drei beimpften Nährbodenstücken, die Griseofulvin in verschiedenen Konzentrationen enthalten, beschickt.

Zeichenerklärung: AK = Kontrolle
0,25 = Griseofulvinkonzentration von 0,25 µg/ml
0,5 = Griseofulvinkonzentration von 0,5 µg/ml

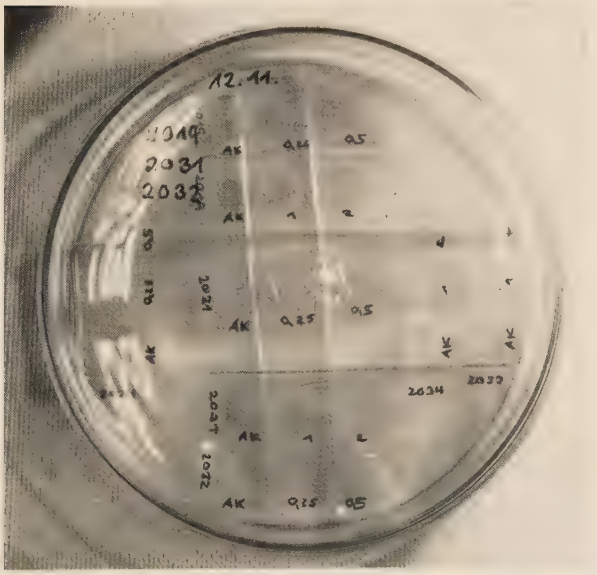

Abb. 4: Aufbewahrung und Bebrütung mehrerer Objektträger in einer sterilen feuchten Kammer. Auf den gebogenen Glasstäbchen können die Objektträger auch gestapelt werden.

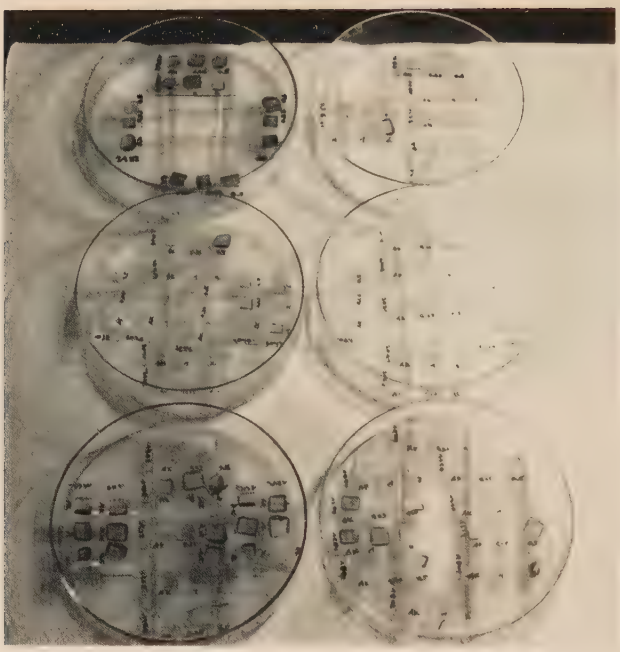

Abb. 5: Versuchsreihe mit sechs feuchten Kammern, in denen Objektträger bebrütet werden.

Auch bei dieser Methode mußten die Objektträger zur mikroskopischen Betrachtung aus der feuchten Kammer genommen werden. Aber da die Oberfläche des Nährmediums abgedeckt war und nur die millimeterhohen seitlichen Nährbodenflächen Luftzufuhr hatten, blieb die Verunreinigung durch Anflugssporen gering. Einzelne verunreinigte Objektträger konnten zudem entfernt werden, ohne daß der gesamte Inhalt einer feuchten Kammer verworfen werden mußte.

4. *Methodik eines Reinigungsversuches des Direktmaterials von Schimmelpilzsporen*

Schwierigkeiten bei der Beurteilung des Dermatophytenwachstums auf den griseofulvinhaltigen Nährboden bereitete uns nicht nur die Verunreinigung durch Anflugsporen, sondern auch Verunreinigungen, die im Direktmaterial schon vorhanden waren. Es handelte sich dabei entweder um exogene Kontaminationen, die keinen Einfluß auf das klinische Krankheitsbild hatten oder um Mischinfektionen bestehend aus Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen. In beiden Fällen überwucherten die nicht griseofulvinempfindlichen Pilze das Wachstum der Dermatophyten auf unserer Griseofulvinreihe. Über die Griseofulvinempfindlichkeit der Dermatophyten konnte in diesen Fällen kein genauer Befund erhoben werden, und wir mußten alle diese Präparate verwerfen.

Wir versuchten deshalb in einer gesonderten Versuchsserie das Direktmaterial der Patienten von Schimmelpilzsporen zu reinigen. Dazu wurde Material von 100 Patienten verwendet, das im Nativpräparat positiv bewertet worden war.

Von diesem zerkleinerten Material, vorwiegend Hautschuppen und Nagelsubstanzen wurde ein Teil ohne Vorbehandlung auf die eine Hälfte steril gegossener Hamburger-Test-Agar-Platten punktförmig aufgeimpft und entsprechend markiert. Den anderen Teil des Materials versetzten wir in einem Zentrifugenröhrchen mit ein paar Tropfen 70%igem Alkohol und füllten mit einigen Millilitern Aqua dest. auf. Die steril verschlossenen Röhrchen wurden dann drei bis 5 Minuten bei mittlerer Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgekippt und das „gewaschene" dermatophytenhaltige Sediment auf die andere Hälfte der Nährbodenplatte geimpft.

Nach 8tägiger, spätestens aber nach 14tägiger Bebrütung konnten die Platten abgelesen und das Wachstum auf den beiden Hälften miteinander verglichen werden.

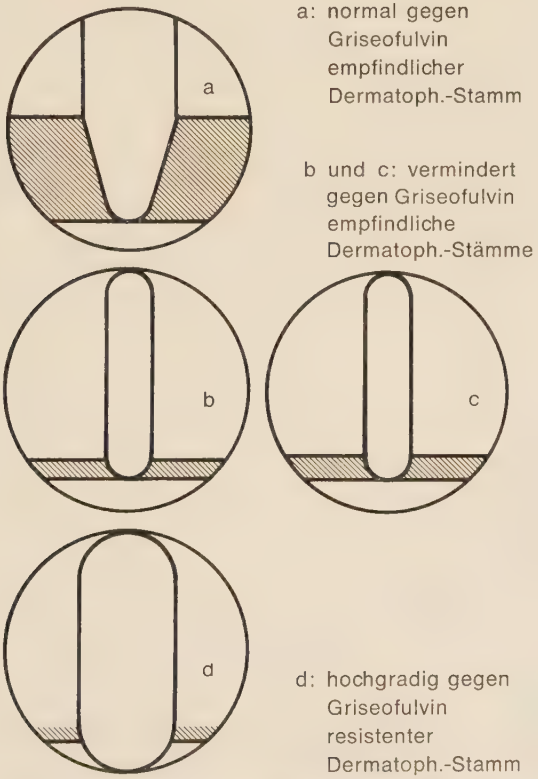

Abb. 6: Abbildung aus der Arbeit von *Dittmar* (35). Sie zeigt das Wachstumsbild eines normal griseofulvinempfindlichen, zweier vermindert griseofulvinempfindlichen und eines hochgradig gegen Griseofulvin resistenten Dermatophyten. Die Schraffierung soll die unterschiedlichen Wachstumskrümmungen der Pilze veranschaulichen.

5. *Methodik eines vereinfachten Verfahrens zur schnellen in vitro-Bestimmung der Griseofulvinresistenz von Dermatophyten nach Dittmar* (35)

Von *Dittmar* wurde ein Verfahren angegeben, das anzeigen soll, ob die Griseofulvinempfindlichkeit eines Dermatophytenstammes im Rahmen der Normalempfindlichkeit liegt. An Hand dieses Verfahrens versuchten wir die Griseofulvinempfindlichkeit einiger Dermatophyten zu prüfen, die aus dem Direktmaterial auf der Griseofulvinreihe gewachsen waren und weniger empfindlich als andere Stämme auf das antimykotische Agens reagiert hatten.

Die Grundlage dieses Verfahrens bildet die Beobachtung, daß ein Dermatophyt mit einer starken Krümmung seines Kolonierandes wächst, wenn er entlang eines geraden Striches auf dem Nährboden einer Petrischale geimpft und wenn an das eine Ende des Impfstriches punktförmig eine Griseofulvinsuspension aufgebracht wird.

Die Krümmung des Kolonierandes wandert dann mit fortschreitender Kulturdauer vom Diffusionszentrum des Griseofulvins weg. Dieses Wachstumsbild soll nach *Dittmar* unabhängig von der Griseofulvinkonzentration, der Beschaffenheit und Dicke des Nährbodens sein.

Ein normal empfindlicher Dermatophyt zeigt nach diesem Verfahren ein Wachstumsbild, das dem eben geschilderten entspricht, während ein Heranrücken des Wachstumsknickes an den Griseofulvinauftragspunkt mit einer Verminderung der Empfindlichkeit gleichzusetzen ist.

Folgende der Arbeit von *Dittmar* entnommene Abbildung soll die beschriebenen Wachstumsphänomene veranschaulichen (Abb. 6).

Die praktische Durchführung dieses Verfahrens sieht nach *Dittmar* folgendermaßen aus:

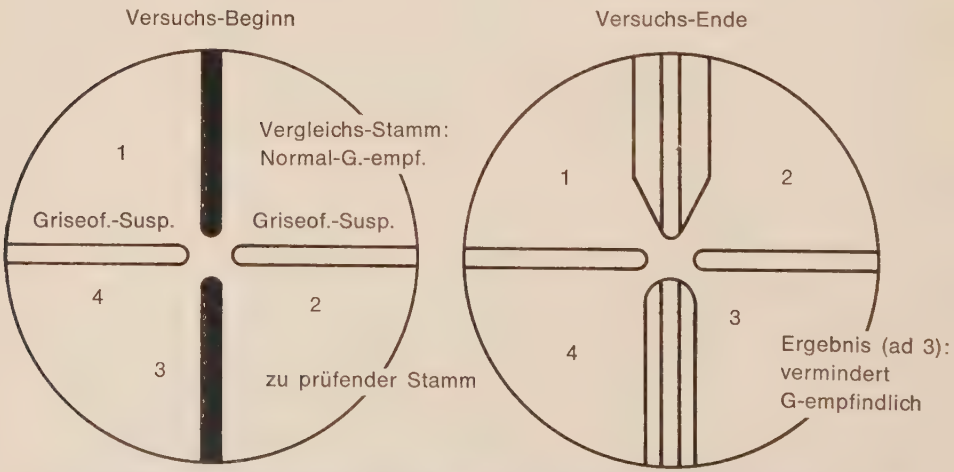

Abb. 7: Abbildung aus der Arbeit von *Dittmar* (35). Eine Petrischale mit dem Prüf- und Vergleichsstamm bei Versuchsbeginn (links) und zu Versuchsende (rechts).

Für jeden zu untersuchenden Stamm wird eine einzige Petrischale verwendet. Auf ihr soll der zu prüfende Stamm, ein Vergleichsstamm mit normaler Griseofulvinempfindlichkeit und die Griseofulvinsuspension aufgetragen werden, wie es Abb. 7 zeigt, die wir auch der Veröffentlichung von *Dittmar* entnahmen.

Die Griseofulvinsuspension wird durch Aufkochen von Griseofulvinpulver oder einer Griseofulvintablette in Wasser erhalten, und der Überstand abgegossen. Mit dem Sediment werden die Impfstriche ausgeführt. Es soll soviel Griseofulvin aufgetragen werden, daß nach Trocknen des Impfstriches eine sichtbare Spur des Antibiotikums auf dem Agar liegt. Nach 4tägiger Aufbewahrung der Platte im Kühlschrank zur Vordiffusion des Griseofulvins kann sie beimpft, sieben bis acht Tage bei Zimmertemperatur bebrütet und dann abgelesen werden.

III. Versuchsergebnisse

1. *Ergebnisse eines Reinigungsversuches des Direktmaterials von Schimmelpilzsporen*

Beim Vergleich des Wachstums aus dem unbehandelten und dem „gewaschenen" Material von 100 Patienten bekamen wir nach der Bebrütung folgende Ergebnisse:

Auf den 100 Nährbodenplatten wuchsen innerhalb von ein oder zwei Wochen *16 Dermatophyten.* Es wuchsen

1.) nur auf der Nährbodenhälfte mit dem *unbehandelten* Untersuchungsmaterial:

2 Trichophyton rubrum-Kolonien,

2.) nur auf der Nährbodenhälfte mit dem *„gewaschenen"* Untersuchungsmaterial:

4 Trichophyton rubrum-Kolonien,

3.) auf *beiden* zugleich, also sowohl aus dem unbehandelten, wie aus dem „gewaschenen" Untersuchungsmaterial:

8 Trichophyton rubrum und
2 Trichophyton mentagrophytes-Kolonien.

Das Wachstum von Hefen stellten wir *25mal* fest. Es wuchsen

1.) nur auf der Plattenhälfte mit dem *unbehandelten* Untersuchungsmaterial:
7 Hefekolonien,

2.) nur auf der Plattenhälfte mit dem *„gewaschenen"* Untersuchungsmaterial:
2 Hefekolonien und

3.) auf *beiden* Plattenhälften zugleich
16 Hefekolonien.

Den größten Anteil bildeten *Schimmelpilze,* die wir auf *105* Nährbodenhälften diagnostizierten, davon

1.) nur auf dem Nährbodenteil mit dem *unbehandelten* Material: 21mal

2.) nur auf dem Nährbodenteil mit dem *„gewaschenen"* Material: 8mal

3.) auf *beiden* Teilen zugleich: 76mal

Eine *Mischflora* von Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen zeigten *7* Plattenhälften. Es entfielen dabei

1.) auf die Hälften mit dem unbehandelten Material:
1mal Hefen und Schimmelpilze
2mal Dermatophyten und Hefen
2mal Dermatophyten und Schimmelpilze

2.) auf die Hälften mit dem *„gewaschenen"* Material:
1mal Hefen und Schimmelpilze
1mal Dermatophyten und Hefen

3.) auf *beiden* Teilen zugleich sahen wir keine Mischflora wachsen.
7 der 100 Nährbodenplatten zeigten kein Pilzwachstum.

Im Vergleich zu dem nötigen Arbeitsaufwand schien uns diese Methode nicht sehr erfolgsversprechend, gelang es uns doch nur 13mal durch „Waschen" Schimmelpilzsporen aus dem Untersuchungsmaterial zu eliminieren, demgegenüber wuchsen in 76 Fällen die Schimmelpilze auch aus dem vorbehandelten Untersuchungsmaterial.

2. *Auskeimungszeit aus dem Patientenmaterial auf der Kontrollkultur*

Als Auskeimungszeit bezeichneten wir die Zeitspanne vom Beimpfen bis zum mikroskopisch sichtbaren Wachstum auf der griseofulvinfreien Kontrollkultur. Wir beobachteten die Kulturen am 1., 2. und 3. Tag nach dem Beimpfen mikroskopisch. Keimte an diesen Tagen kein Pilz aus, so wurden die Kulturen später am Auskeimungstag und den zwei darauf folgenden Tagen beurteilt. Das weitere Wachstum kontrollierten wir außerdem auch nach der 1., 2. und 3. Woche.

Ein Wachstum der griseofulvinfreien Kontrollkultur unserer Verdünnungsreihe sahen wir bei den *172* überimpften Materialien nach Auskeimungszeiten, die von 1 bis zu 21 Tagen differierten (Tab. 2).

Tab. 2: Beobachtete Auskeimungszeiten bei überimpften Material von 172 Patienten.

nach	1	Tag	auf	2 Kulturen
nach	2	Tagen	auf	7 Kulturen
nach	3	Tagen	auf	11 Kulturen
nach	4	Tagen	auf	11 Kulturen
nach	5	Tagen	auf	6 Kulturen
nach	6	Tagen	auf	14 Kulturen
nach	7	Tagen	auf	17 Kulturen
nach	8	Tagen	auf	7 Kulturen
nach	9	Tagen	auf	7 Kulturen
nach	12	Tagen	auf	1 Kultur
nach	12	Tagen	auf	4 Kulturen
nach	15	Tagen	auf	3 Kulturen
nach	16	Tagen	auf	3 Kulturen
nach	20	Tagen	auf	5 Kulturen
nach	21	Tagen	auf	4 Kulturen

Aus dem Material von 70 Patienten konnte nach 3 Wochen kein Wachstum auf der Kontrollkultur unserer Griseofulvinreihe festgestellt werden, obwohl es nach den Ergebnissen des mykologischen Labors pilzpositiv war.

Die 102 Fälle, die nach den unterschiedlichen Beobachtungszeiten ein Pilzwachstum zeigten, konnten erst nach weiterem Wachstum und nach Ausbildung des Luftmycels mit seinen charakteristischen Fruchtformen auf der Kontrollkultur diagnostiziert werden.

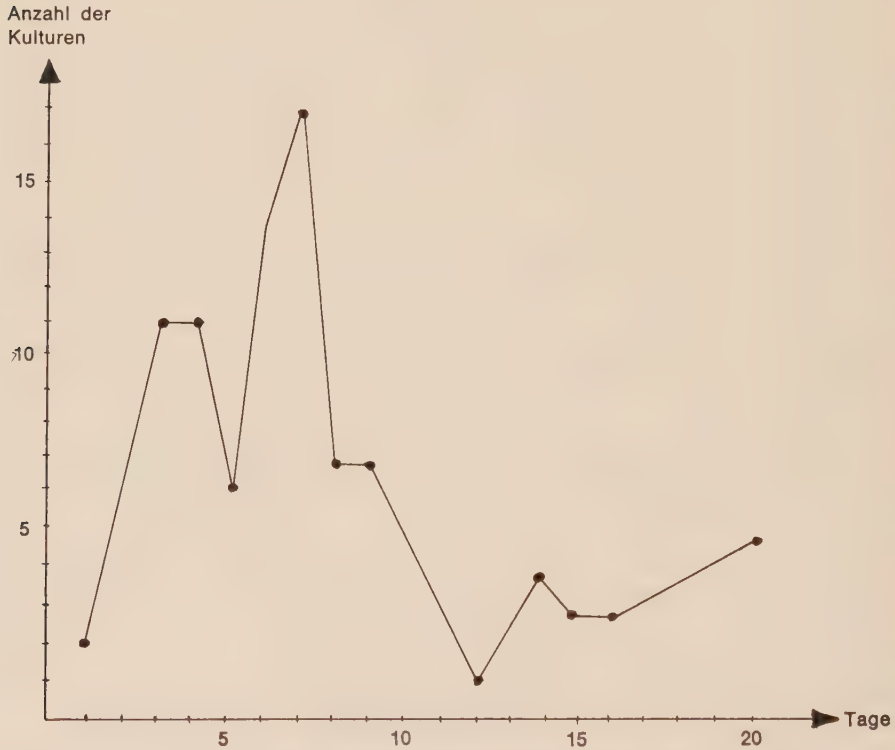

Abb. 8: Auskeimungszeiten von 172 überimpften Dermatophyten. Abszisse: Auskeimungszeit in Tagen, Ordinate: Anzahl der Kulturen.

3. *Identifizierung der isolierten Dermatophyten*

Gleichzeitig zu unseren Untersuchungen auf der Griseofulvinreihe wurden im mykologischen Labor die routinemäßigen Reinkulturen vom Material derselben 172 Patienten zur Bestätigung des Diagnoseverdachtes „Mykose" angelegt.

Nach 8 bis 24 Tagen verglichen wir die Ergebnisse dieser routinemäßigen Kulturen mit unseren eigenen der Griseofulvinreihe.

In den Routinekulturen wurden aus dem Material, der von uns untersuchten 172 Patienten innerhalb einer bis drei Wochen folgende Pilze festgestellt (Tab. 3):

Tab. 3: Identifizierung der Pilze von 172 Patienten in der Routinekultur

120 T. rubrum
davon 5mal in Kombination mit Hefen
20mal in Kombination mit Schimmelpilzen
1mal in Kombination mit Hefen und Schimmelpilzen
17 T. mentagrophytes
davon 2mal in Kombination mit Schimmelpilzen
3 E. floccosum
1 T. violaceum
3 Hefen
14 Schimmelpilze
3 Hefen und Schimmelpilze
11 kein Pilzwachstum

172

Eine Gegenüberstellung der Diagnosen dieser Routinekulturen zu unseren aus den Kontrollkulturen der Griseofulvinreihe ergab für die 172 Patienten:

Tab. 4: Vergleich der vom gleichen Ausgangsmaterial gewonnenen Kulturergebnisse im mykologischen Labor und in den eigenen Untersuchungen.

Routinekultur (Mykolog. Labor)	*Kontrollkultur der Griseofulvinreihe* (Eigene Untersuchungen)
120 T. rubrum	
94mal T. rubrum	42mal *T. rubrum*
	10mal Schimmelpilze
	1mal Schimmelpilze und Hefen
	1mal Hefen
	40mal kein Wachstum
5mal T. rubrum und Hefen	2mal Hefen
	1mal Hefen und Schimmelpilze
	2mal kein Wachstum
20mal T. rubrum und Schimmelpilze	10mal Schimmelpilze
	10mal kein Wachstum
1mal T. rubrum, Hefen und Schimmelpilze	1mal kein Wachstum
	120
17 T. mentagrophytes	
15 T. mentagrophytes	10mal *T. mentagrophytes*
	1mal Schimmelpilze
	4mal kein Wachstum
2mal T. mentagrophytes und Schimmelpilze	2mal kein Wachstum
	17
3 E. floccosum	
3mal E. floccosum	2mal *E. floccosum*
	1mal kein Wachstum
1 T. violaceum	
1mal T. violaceum	1mal *T. violaceum*
31mal Hefen, Schimmelpilze oder kein Wachstum	31mal kein Wachstum

Auf der Griseofulvinreihe mußten wir alle Kulturen mit einer Mischflora verwerfen, da die griseofulvin-unempfindlichen Pilze das Wachstum der Dermatophyten überwucherten oder weil das ebenfalls geschlängelt wachsende Mycel der Schimmelpilze zur Verwechslung der Dermatophyten hätte führen können.

Eine sichere Aussage über die Griseofulvinempfindlichkeit der Dermatophyten auf dem Direktmaterial konnten wir aus *55* der 172 angelegten Griseofulvinreihen machen.

Dabei handelte es sich um folgende Dermatophyten:

Trichophyton rubrum	(42mal)
Trichophyton mentagrophytes	(10mal)
Trichophyton floccosum	(2mal)
Trichophyton violaceum	(1mal)

4. *Auskeimungszeiten auf Nährböden mit verschiedenen Griseofulvinkonzentrationen*

Auf den griseofulvinhaltigen Nährböden war in vielen Fällen eine verzögerte Auskeimungszeit festzustellen. Eine Übersicht über das Wachstum unter Griseofulvineinwirkung, beziehungsweise der zeitliche Wachstumsabstand zur Kontrolle ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tab. 5: Vergleich des beginnenden Wachstums in der griseofulvinfreien Kontrollkultur und in den griseofulvinhaltigen Kulturen.

Zeitlicher Abstand der Auskeimung auf griseofulvinhaltigen Nährböden	*Pilzart*
gleichzeitig	24mal T. rubrum
	8mal T. mentagrophytes
	2mal E. floccosum
1 Tag später	2mal T. rubrum
	1mal T. mentagrophytes
10—14 Tage später	3mal T. rubrum
2— 4 Tage später	3mal T. rubrum
19 Tage später	1mal T. rubrum

5. *Mikromorphologische Veränderungen des aus dem Direktmaterial unter Griseofulvineinwirkung gewachsenen Mycels*

a) *in Abhängigkeit von der Griseofulvinkonzentration im Nährboden Beobachtungen bei 0,25 µg Griseofulvin/ml:*

Bei der Konzentration von 0,25 µg Griseofulvin pro ml im Nährboden sahen wir bei allen Dermatophyten ein Mycel wachsen, das im Vergleich zu der griseofulvinfreien Kontrolle eine deutliche *Längenwachstumsminderung* zeigte. Während in den Kontrollkulturen gerade Keimschläuche gebildet wurden (Abb. 8), entwickelte das Mycel unter Griseofulvineinwirkung den *„curling effect"* (Abb. 9), sobald es eine Länge erreicht hatte, die eine solche Schlängelung zuließ.

Diese Veränderungen zeigten alle 33 Dermatophyten, die bei dieser Konzentration wuchsen. Nur in einem Fall beobachteten wir einen *„curling effect", aber kaum einen Unterschied im Längenwachstum* verglichen mit dem Mycel der Kontrolle.

Trotz der Schädigung des vegetativen Mycels konnten fünf der aus dem Direktmaterial gewachsenen Dermatophyten ein *Luftmycel* bilden. Dieses zeigte keinerlei Veränderung in der Morphologie, während das vegetative Mycel in der oben beschriebenen Weise verändert war.

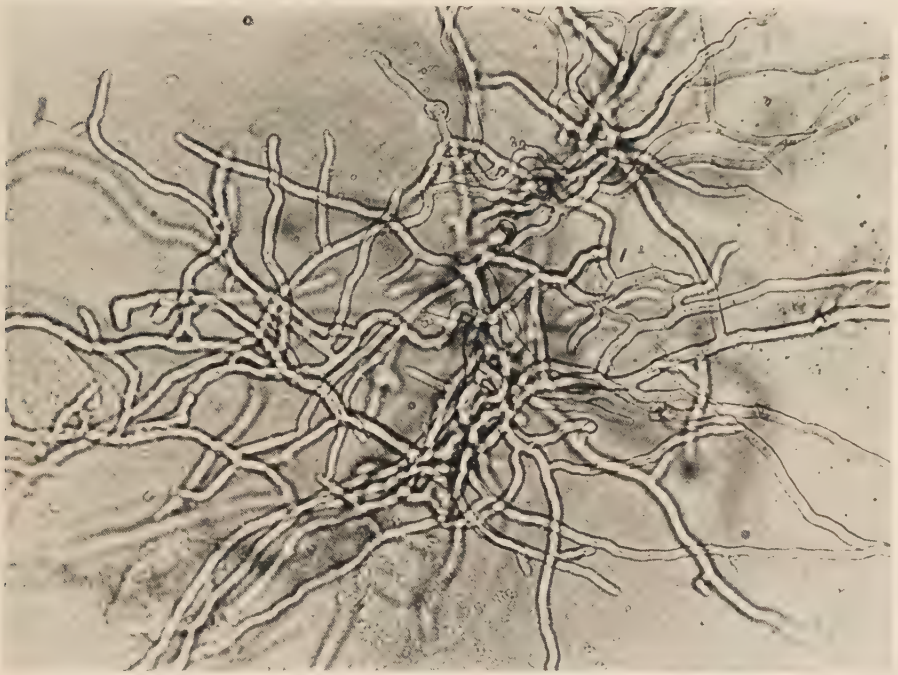

Abb. 9: Kontrollkultur ohne Griseofulvin am 6. Tag nach Aufimpfung. Material aus einem extrahierten Nagel (Vergr. 25).

Bei zwei Dermatophyten fiel uns auf, daß *neben den lockenartig verdrehten Hyphen ein gerades, scheinbar ungeschädigtes Mycel* wuchs. Allerdings war sein Längenwachstum im Vergleich zur Kontrollkultur erheblich vermindert.

Die stärksten Veränderungen, die das Griseofulvin am Mycel der Dermatophyten bewirkt, sahen wir bei der sehr niedrigen Konzentration von 0,25 µg/ml sehr selten. In einem Fall kam es zu einer Hyphenverknäuelung, und drei Dermatophyten stellten ihr Wachstum ein. Kugelige Anschwellungen der Mycelenden und Cytoplasmaaustritte beobachteten wir bei dieser Konzentration nicht.

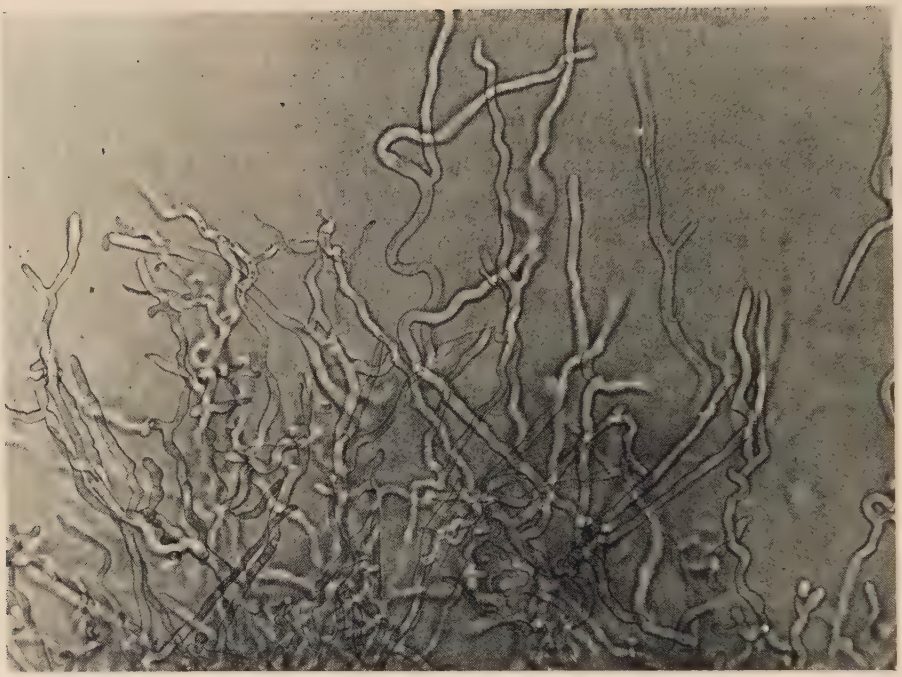

Abb. 10: Material, Wachstumszeit und Vergrößerung wie Abb. 9. Längenwachstumsminderung und „curling effect" Griseofulvinkonzentration im Nährboden 0,25 µg/ml.

Beobachtungen bei 0,5 µg/ml:

Ein Wachstum bei der Konzentration von 0,5 µg/ml erzielten wir bei insgesamt 22 der 55 Dermatophyten, deren Griseofulvinempfindlichkeit beurteilt werden konnte. Zu den mikromorphologischen Veränderungen im Sinne des „curling effects" und dem verminderten Längenwachstum kamen bei der Konzentration von 0,5 µg/ml Griseofulvin im Nährboden noch andere Schädigungen hinzu. Abgesehen davon, daß das Mycel in seinem Längenwachstum jetzt noch weiter hinter dem der Kontrollkultur (Abb. 10) zurückblieb, traten schon vereinzelt abnorm *angeschwollene Hyphenenden* und *Hyphenverknäuelungen* (Abb. 11) auf. In zwei Fällen war die Schädigung so stark, daß das Wachstum nach einiger Zeit sistierte. Zwei andere Dermatophyten bildeten aber auch noch ein *Luftmycel,* das keine Schädigung aufwies.

Beobachtungen bei 1 µg/ml:

Auf den Nährböden mit der Griseofulvinkonzentration von 1 µg/ml wuchsen 18 Dermatophyten aus dem Direktmaterial. Ihr Mycel war so stark in seinem Längenwachstum gehemmt, daß neben dem Bild der lockenartigen Hyphenverdrehung praktisch nur noch *verkrüppelte, plumpe Mycelien* in Erscheinung traten.

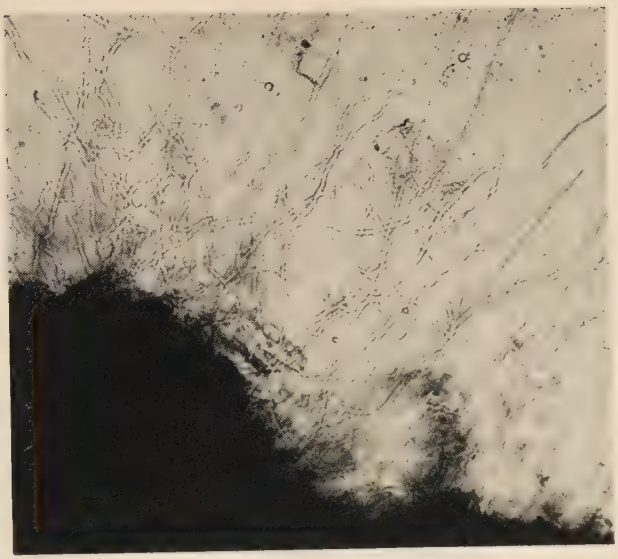

Abb. 11: Kontrollkultur ohne Griseofulvin; 6. Tag nach Überimpfung (Vergr. 10).

Abb. 12: Griseofulvinkonzentration 0,5 µg/ml im Nährboden; 6. Tag nach Überimpfung: vermindertes Längenwachstum „curling effect"; Hyphenverknäuelungen (Vergr. 10).

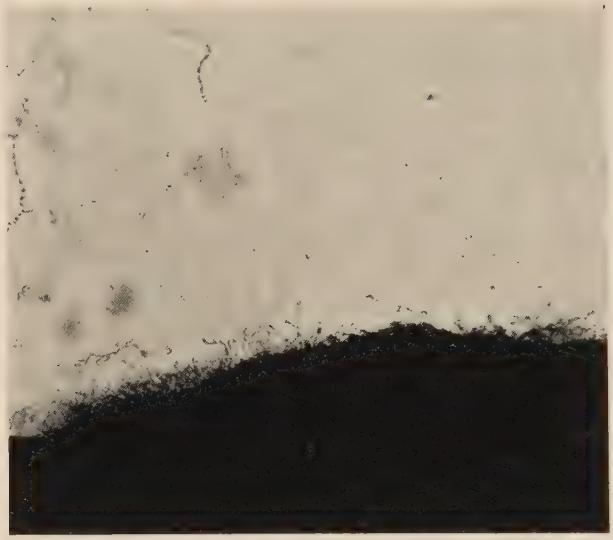

Abb. 13: Griseofulvinkonzentration 6,0 µg/ml im Nährboden; 2. Tag nach Überimpfung. Es kam in den folgenden Tagen zu keinem weiteren Längenwachstum. Die verunstalteten Hyphen platzten an den Enden und lösten sich bis zum 6. Tag fast vollständig auf (Vergr. 10).

Ein Dermatophyt zeigte bereits Körnelung im Zytoplasma eines ballonartig angeschwollenen Hyphenendes, das später aufplatzte und zum Austritt des Zytoplasmas führte. Ein anderer Dermatophyt stagnierte im Wachstum, ohne daß es vorher zu kugeligen Anschwellungen und zum Austreten von Zytoplasma gekommen war.

Beobachtungen bei 2 µg/ml:

Zwölf Dermatophyten wuchsen auf Nährböden mit einer Konzentration von 2 µg/ml Griseofulvin pro ml. Neben den schon beschriebenen Veränderungen, wie ein stark reduziertes Längenwachstum und dem „curling effect", wurden die schwerwiegenden Störungen der Hyphenmorphe häufiger. Drei Pilze zeigten *Körnelung* ihres Zytoplasmas, vier bildeten nur noch Mycelien mit *blasig aufgetriebenen* Enden, von denen einzelne aufplatzten, so daß es zu *Zytoplasmaaustritten* kam.

Beobachtungen bei 6,0 µg/ml:

Bei der Konzentration von 6,0 µg/ml Griseofulvin im Nährboden (Abb. 13, 14) wuchsen 15 der von uns untersuchten Dermatophyten aus dem Direktmaterial, bei denen die Schädigungen im Mycel nach weiter fortgeschritten waren. Wir sahen hauptsächlich morphologische Veränderungen in Form von *ballonartigen Auftreibungen* am Hyphenende und *verunstaltetes, verkürztes Mycel.* 10 Dermatophyten bildeten anfangs noch so lang Hyphen, daß ein „curling effect" erkennbar war. In acht Fällen war das Mycel an seinen Enden blasig aufgetrieben und in sieben Präparaten dieser Konzentration zeigte sich eine *Granulierung des Protoplasmas.* Schließlich platzten acht derart verunstaltete Hyphenenden auf, so daß es zum *Austreten des Zytoplasmas* und zur *Auflösung des Mycels* kam.

b) *Mikromorphologische Veränderungen in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des Griseofulvins*

Außer der Art der Schädigung, die das Griseofulvin in den verschiedenen Konzentrationen am Mycel der Dermatophyten verursachte, interessierte uns auch, wie lange es dauerte, bis diese mikromorphologischen Veränderungen manifest wurden.

Auf den Nährböden mit der Griseofulvinkonzentration von 0,25 µg/ml wuchsen im Rahmen unserer Versuche *33* Dermatophyten.

Bis zum Wachstumsbeginn mit Ausbildung des *„curling effects"* und bis zu dem Zeitpunkt, an dem wir ein vermindertes *Längenwachstum* im Vergleich zu Kontrollkultur feststellten, war eine unterschiedliche Beobachtungszeit notwendig (Tab. 6).

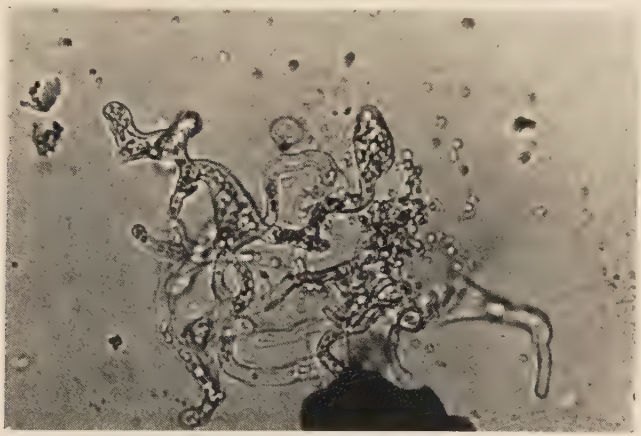

Abb. 14: Griseofulvinkonzentration 6,0 µg/ml im Nährboden; 2. Tag nach Überimpfung (Vergr. 25). Granulierung des Protoplasmas, Hyphenenden aufgetrieben.

Tab. 6: Wachstumsbeginn bei einer Griseofulvinkonzentration von 0,25 µg/ml.

bei 3 Dermatophyten	2 Tage
bei 3 Dermatophyten	3 Tage
bei 4 Dermatophyten	4 Tage
bei 7 Dermatophyten	5 Tage
bei 1 Dermatophyten	6 Tage
bei 6 Dermatophyten	7 Tage
bei 3 Dermatophyten	8 Tage
bei 2 Dermatophyten	9 Tage
bei 1 Dermatophyten	14 Tage
bei 1 Dermatophyten	16 Tage
bei 2 Dermatophyten	20 Tage

Ein ungeschädigtes *Luftmycel* wurde bei der Konzentration von 0,25 µg/ml nach 3, 6, 11, 20 und 21 Tagen gebildet. Wie wir bei der Methodik unserer Untersuchungen ausführten, wurden die beimpften Agarblöcke mit einem Deckglas abge-

deckt. Um ein Luftmycel bilden zu können, mußte also das vegetative Mycel erst den Rand der Objektträgerkultur erreicht haben. Obwohl wir das Material auf die Ecken des Nährbodens aufimpften, bestand durchaus die Möglichkeit, daß der Dermatophyt an der dem freien Rand abgewendeten Seite des Materials auskeimte und deshalb eine längere Wachstumszeit brauchte, um am freien Nährbodenrand das Luftmycel auszubilden.

Die beobachtete *Verknäuelung* der Hyphen trat nach sieben Tagen bei einem Dermatophyten im Nährboden mit 0,25 µg/ml Griseofulvin pro ml im Nährboden auf.

Zu einem *Wachstumsstillstand* kam es einmal am 21. und zweimal am 34. Tag nach der Beimpfung.

Eine *Längenwachstumsminderung* und der *„curling effect"* wurden bei der Konzentration von *0,5 µg/ml* nach folgenden Zeiten ausgebildet (Tab. 7):

Tab. 7: Wachstumsbeginn bei einer Griseofulvinkonzentration von 0,5 µg/ml.

von 1 Dermatophyten nach	2 Tagen
von 3 Dermatophyten nach	3 Tagen
von 2 Dermatophyten nach	4 Tagen
von 2 Dermatophyten nach	5 Tagen
von 1 Dermatophyten nach	6 Tagen
von 3 Dermatophyten nach	7 Tagen
von 1 Dermatophyten nach	8 Tagen
von 2 Dermatophyten nach	9 Tagen
von 2 Dermatophyten nach	11 Tagen
von 1 Dermatophyten nach	13 Tagen
von 1 Dermatophyten nach	14 Tagen
von 1 Dermatophyten nach	16 Tagen
von 2 Dermatophyten nach	21 Tagen

Anschwellungen der Hyphenenden sahen wir bei dieser Konzentration nach drei und die *Verknäuelung* nach vier Tagen. Das *Luftmycel* wurde am 15. Tag gebildet. Am 16. Tag stellten zwei Dermatophyten bei der Konzentration von 0,5 µg/ml ihr Wachstum ein.

Die Ausbildung des *„curling effects"* bei der Griseofulvinkonzentration von 1,0 µg/ml dauerte (Tab. 8):

Tab. 8: Wachstumsbeginn bei einer Griseofulvinkonzentration von 1,0 µg/ml.

bei 5 Dermatophyten	3 Tage
bei 3 Dermatophyten	4 Tage
bei 2 Dermatophyten	5 Tage
bei 1 Dermatophyten	6 Tage
bei 3 Dermatophyten	7 Tage
bei 1 Dermatophyten	9 Tage
bei 1 Dermatophyten	12 Tage
bei 1 Dermatophyten	13 Tage
bei 1 Dermatophyten	25 Tage

Eine *Körnelung des Protoplasmas* beobachteten wir am dritten, einen vollständigen Wachstumsstillstand in einem Fall am neunten Tag nach Aufimpfung des pilzhaltigen Materials.

Die 12 Dermatophyten, die bei der Konzentration von 2,0 µg/ml Griseofulvin pro ml wuchsen, benötigten zum Wachstum mit dem *„curling effect"* (Tab. 9):

Tab. 9: Wachstumsbeginn bei einer Griseofulvinkonzentration von 2,0 µg/ml.

1 Dermatophyt	2 Tage
4 Dermatophyten	3 Tage
1 Dermatophyt	4 Tage
1 Dermatophyt	5 Tage
3 Dermatophyten	7 Tage
1 Dermatophyt	15 Tage
1 Dermatophyt	21 Tage

Die beschriebene *Granulierung* im Zytoplasma trat zweimal nach zehn und einmal nach zwölf Tagen auf. Mycel mit *blasig aufgetriebenen Enden* wurde am zweiten, dritten und zweimal am siebten Tag gebildet.

Bei der höchsten Konzentration von 6,0 µg Griseofulvin pro ml Nährboden wuchsen 15 Dermatophyten. Um einen „curling effect" auszubilden oder um in verunstalteter Form mit *kleinen, dicken* und *verkrüppelten Hyphen* zu wachsen dauerte es (Tab. 10):

Tab. 10: Wachstumsbeginn bei einer Griseofulvinkonzentration von 6,0 µg/ml.

bei 3 Dermatophyten	3 Tage
bei 2 Dermatophyten	4 Tage
bei 4 Dermatophyten	5 Tage
bei 4 Dermatophyten	7 Tage
bei 1 Dermatophyten	15 Tage
bei 1 Dermatophyten	21 Tage

Blasig aufgetriebene Hyphenenden wurden im Zeitraum von 3 bis 15 Tagen nach der Überimpfung gebildet (Tab. 11).

Tab. 11: Ausbildung blasig aufgetriebener Hyphenenden.

1 Dermatophyten nach	3 Tagen
2 Dermatophyten nach	5 Tagen
3 Dermatophyten nach	7 Tagen
1 Dermatophyten nach	9 Tagen
1 Dermatophyten nach	15 Tagen

Eine *Cytoplasmagranulierung* beobachteten wir bei dieser Konzentration nach drei und zehn Tagen im Mycel.

c) *Mikromorphologische Veränderungen durch Griseofulvin in Abhängigkeit von der Pilzart*

Die von uns aus dem Patientenmaterial gezüchteten Dermatophyten zeigten auf den verschiedenen griseofulvinhaltigen Nährböden nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer die schon beschriebenen Veränderungen ihrer Hyphenmorphe. Aufgeschlüsselt nach der Pilzart ergab sich folgendes Bild:

Beobachtungen bei Trichophyton rubrum:

Von den 42 Dermatophyten der Art Trichophyten rubrum wuchsen unter Hemmung des *Längenwachstums* und unter Ausbildung des *„curling factors"* bei der Konzentration von *0,25* µg/*ml* 26 Stämme.

Davon keimten 2 einen Tag, 2 zwei und drei Tage und 1 zehn Tage später als die Kontrollkultur aus.

Am 7. Tag nach Überimpfung zeigte 1 T. rubrum-Stamm eine starke *Hyphenverknäuelung.* Kein weiteres Wachstum in dieser Konzentrationsstufe sahen wir bei 3 T. rubrum-Stämmen nach dreiwöchiger Einwirkungsdauer.

4 T. rubrum-Stämme bildeten auf Nährböden mit 0,25 µg Griseofulvin pro ml noch ein ungeschädigtes *Luftmycel* aus und zwar nach 6-, 11-, 20- und 21tägiger Beobachtungsdauer.

Neben dem lockenartig verdrehten vegetativen Mycel sahen wir bei T. rubrum in zwei Fällen ein gerades vegetatives Mycel am 11. und 12. Tag nach der Überimpfung. Dieses Mycel war nur in seinem Längenwachstum gehemmt.

14 T. rubrum-Stämme wuchsen auf Nährböden, die 0,5 µg Griseofulvin pro ml enthielten. Die zeitliche Wachstumsdifferenz zur griseofulvinfreien Kontrolle betrug bei je einem Stamm 2, 3, 4 und 12 Tage, bei 2 Stämmen 6 Tage.

Abgesehen von der *starken Hemmung des Längenwachstums* und dem „curling effect", beide Veränderungen waren noch ausgeprägter als bei der niedrigeren Konzentrationsstufe, zeigten 2 Kulturen am 11. und 16. Tag einen Wachstumsstillstand. Nach *Verknäuelung* einzelner Hyphen kam es zur *Rhexis der ballonartig aufgetriebenen Enden* und zu *Cytoplasmaaustritten.*

Noch schädigender wirkten sich *1,0* µg Griseofulvin pro ml im Nährboden auf die Hypenmorphologie aus. Hier wuchsen von T. rubrum 12 Stämme. Der zeitliche Wachstumsunterschied zur Kontrolle betrug zweimal 2 und 4, einmal 8 und 19 Tage. Sechsmal war kein zeitlicher Unterschied feststellbar. Ein Luftmycel wuchs bei dieser und allen höheren Konzentrationen nicht mehr.

Auf Nährböden mit *2,0* µg Griseofulvin pro ml beobachteten wir eine Körnelung des Cytoplasmas bei T. rubrum in drei Fällen. Diese Pilzart wuchs viermal zur selben Zeit, zweimal 2 und 4 Tage später als in der Kontrolle. Insgesamt keimten 8 T. rubrum-Stämme aus. Zwei entwickelten nur die bekannte *lockenartige Verdrehung* und ein im *Längenwachstum gestörtes Mycel.* Während bei den sechs anderen diese Nährbodenkonzentration *Hyphenrhexis* und *Cytoplasmaaustritte* verursachte.

T. rubrum wuchs 11mal auf Nährböden mit der Griseofulvinkonzentration von 6,0 µg/ml. Hier sahen wir wieder 3mal eine *Cytoplasmagranulierung*, ehe das Mycel aufriß und den Zellinhalt freigab. Der zeitliche Auskeimungsunterschied zur Kontrolle betrug einmal 1 Tag, zweimal 2, viermal 2 und einmal 11 Tage. Fünfmal ließ sich keine zeitliche Differenz erkennen. Die mikromorphologischen Veränderungen waren aber immer so stark, daß ein *Wachstumsstillstand* die Folge war.

Beobachtungen bei Trichophyton mentagrophytes:

Die Pilzart Trichophyton mentagrophytes entwickelte fünfmal auf Nährböden von *0,25* µg Griseofulvin pro ml ein Mycel mit *vermindertem Längenwachstum* und dem *„curling effect"*, immer zur gleichen Zeit, zu der in der Kontrollkultur das ungeschädigte Mycel wuchs. Ein T. mentagrophytes-Stamm konnte auch noch ein gesundes Luftmycel bilden.

Die 6 T. mentagrophytes-Stämme, die bei *0,5* µg/*ml* Griseofulvin wuchsen, verhielten sich wie T. rubrum bei dieser Konzentration. Dreimal keimten sie einen Tag später als in der Kontrolle aus. Bei einem Stamm bemerkten wir noch ein ungeschädigtes *Luftmycel*, in zwei Fällen war das vegetative Mycel schon so sehr geschädigt, daß seine Enden abnorm anschwollen.

Auf Nährböden mit *1,0* µg Griseofulvin pro ml wuchsen 5 T. mentagrophytes-Stämme. Der zeitliche Wachstumsunterschied zur griseofulvinfreien Kontrolle betrug dreimal 1 Tag und war zweimal nicht nachzuweisen.

Die durch Griseofulvin verursachten mikromorphologischen Störungen waren wiederum der „curling effect" und ein vermindertes Längenwachstum mit verkrüppelten Hyphen.

Die vier Stämme, die bei *2,0* µg Griseofulvin pro ml wuchsen, waren ebenfalls morphologisch stark geschädigt, zum *Zerreißen des Mycels* kam es aber nur in einem Fall. Im übrigen keimte T. mentagrophytes auch hier immer gleichzeitig zur Kontrollkultur aus.

Alle drei T. mentagrophytes-Stämme, die bei der höchsten Konzentration der Versuchsreihe von *6,0* µg/*ml* Griseofulvin wuchsen, konnten nur noch ein ganz *kurzes, angeschwollenes und verkrüppeltes Mycel* bilden. Schon nach 5 Tagen trat ein Wachstumsstillstand ein, nachdem die blasig verunstalteten Hyphen platzten und aufgelöst wurden.

Beobachtungen bei Epidermophyton floccosum:

Die beiden Griseofulvinreihen, auf denen Epidermophyton floccosum auf seine Griseofulvinempfindlichkeit hin geprüft werden konnte, zeigten bei der Konzentration von *0,25* µg Griseofulvin pro ml ebenfalls ein Mycel, das *lockenartig verdreht* und *sehr viel kürzer* war als in der Kontrolle. Eine zeitliche Wachstumsdifferenz bestand nicht. 12 und 16 Tage nach der Überimpfung stellten beide E. floccosum-Stämme ihr Wachstum ein.

Auf Nährböden mit der höheren Konzentration von *0,5* µg/*ml* verhielt sich E. floccosum ähnlich, nur wurde hier das Wachstum schon am 4. und 7. Tag abgebrochen.

Einer der beiden E. floccosum-Stämme bildete auch noch bei *1,0* µg Griseofulvin pro ml und *6,0* µg/*ml* Hyphen. Seine mikromorphologischen Schädigungen nahmen parallel zur Konzentrationserhöhung zu. Schon nach 4 Tagen waren die *Hyphenenden blasig aufgetrieben*, sie *platzten schließlich auf* und das *Cytoplasma wurde aus den Zellen freigegeben.*

Die Ausbildung eines ungeschädigten Luftmycels sahen wir bei E. floccosum nicht.

9 Stämme der Pilzart T. rubrum,
1 Stamm der Pilzart T. mentagrophytes und
1 Stamm der Pilzart T. violaceum

wuchsen auf keinem Nährboden mit Griseofulvinzusatz. Obwohl wir das Direktmaterial, das diese Pilze enthielten, mindestens dreimal auf die Griseofulvinreihe impften, keimten die Dermatophyten jedesmal *nur auf der Kontrollkultur* aus. Dort wuchsen sie ohne erkennbare mikromorphologische Veränderungen.

Diese Dermatophyten waren anscheinend so hochgradig griseofulvinempfindlich, daß kein Wachstum bei Vorhandensein des antimykotischen Agens möglich war.

6. *Ergebnisse nach dem „vereinfachten Verfahren zur schnellen in-vitro-Bestimmung der Griseofulvinresistenz von Dermatophyten" nach Dittmar (35)*

Einige Dermatophyten, die aus dem Patientenmaterial auf griseofulvinhaltigen Nährböden gewachsen waren, versuchten wir auch an Hand des von *Dittmar* angegebenen Verfahrens auf ihre Griseofulvinempfindlichkeit hin zu prüfen. Dazu konnten wir 7 T. rubrum-, 2 T. mentagrophytes- und 1 E. floccosum-Stämme verwenden.

Auf der *Griseofulvinreihe* waren diese 7 T. rubrum-Stämme mit folgenden Merkmalen gewachsen:

Sie keimten bei der Konzentration von 0,25 µg Griseofulvin pro ml zur selben Zeit aus wie in der Kontrollkultur. 3 Stämme bildeten ein ungeschädigtes Luftmycel, und 3 Stämme wiesen neben dem lockenartig verdrehten ein ungelocktes, nur im Längenwachstum gegenüber der Kontrolle zurückgebliebenes Mycel auf. Ein T. rubrum war uns durch ein besonders dichtes und starkes Wachstum auf der Griseofulvinreihe aufgefallen.

Die beiden für dieses Verfahren ausgewählten T. mentagrophytes-Stämme waren auch gleichzeitig mit der Kontrollkultur ausgekeimt, der eine auf dem Nährboden mit 0,25 µg, der andere mit 0,5 µg Griseofulvin pro ml. Beide Stämme hatten auf Nährmedien dieser Konzentration ungeschädigte Luftmycelien gebildet.

Von den beiden E. floccosum-Stämmen, die wir aus dem Direktmaterial auf der Griseofulvinverdünnungsreihe züchten konnten, verwendeten wir diejenigen, der noch bei einer Konzentration von 6,0 µg/ml gewachsen war.

Wie von *Dittmar* angegeben, überimpften wir die Dermatophyten auf Petrischalen mit Kimmig-Test-Agar. Auf die eine Seite des Impfstriches wurden die zehn auf der Objektkultur bei 0,25 µg/ml, beziehungsweise 0,5 µg/ml aus dem Direktmaterial gewachsenen Dermatophyten, auf die andere Seite Vergleichsstämme aus Reinkulturen derselben Pilzart wie der zu prüfende Stamm aufgetragen.

Nach achttägiger Bebrütung ergab sich folgendes Resultat:

3 T. rubrum-Stämme bestätigten ebenso wie die Vergleichsstämme aus Reinkulturen das von *Dittmar* angegebene Wachstumsbild einer normalen Empfindlichkeit, das heißt, der Kulturrand wanderte in starker Krümmung von dem Griseofulvinauftragspunkt weg.

In einer Petrischale wuchs nur der T. rubrum-Vergleichsstamm aus der Reinkultur. Der zu prüfende Dermatophyt zeigte auch nach 14tägiger Bebrütung kein Wachstum. Lediglich ein Dermatophyt der Art T. mentagrophytes zeigte im Vergleich zum Reinkulturstamm, der hochgradig empfindlich reagierte, eine *verminderte Griseofulvinempfindlichkeit*. Er war dicht an die aufgetragene Griseofulvinsuspension herangewachsen.

Diesen Pilz konnten wir auf der Griseofulvinverdünnungsreihe nur auf Nährböden der Konzentration von 0,25 µg/ml züchten, wo er zwar den „curling effect" gezeigt hatte, aber auch schon am 3. Tage nach der Aufimpfung gleichzeitig mit der griseofulvinfreien Kontrolle ein ungeschädigtes Luftmycel gebildet hatte.

7. *Das Dermatophytenwachstum aus dem Untersuchungsmaterial griseofulvinbehandelter Patienten*

Zur Prüfung der Griseofulvinempfindlichkeit von Dermatophyten bekamen wir auch Material von Patienten, die, wie wir wußten, unter einer Griseofulvintherapie standen.

Es handelte sich dabei um 2 Kinder, die an einer Trichophytie des behaarten Kopfes hervorgerufen durch T. mentagrophytes litten.

Von diesen Kindern entnahmen wir Material — Haare und Kopfschuppen — vor dem Beginn der Griseofulvinbehandlung, nach 10tägiger und nach 18tägiger Griseofulvintherapie.

Die Prüfung der Griseofulvinempfindlichkeit dieses Dermatophyten aus dem Untersuchungsmaterial ergab auf der Verdünnungsreihe:

Aus dem Material, das *vor Beginn der Griseofulvintherapie* abgenommen wurde, wuchs am 2. Tag nach Überimpfung in der Kontrollkultur ein Mycel mit geraden Keimschläuchen. Auf den griseofulvinhaltigen Nährböden zeigten sich die bekannte lockenartige Verdrehung und ein vermindertes Längenwachstum. Diese Veränderungen nahmen mit steigender Griseofulvinkonzentration im Nährmedium zu. Am 5. Tag platzten schon vereinzelt blasig aufgetriebene Hyphenenden auf, und es kam zu Cytoplasmaaustritten. Das Wachstum des Pilzes war bei allen Griseofulvinkonzentrationen gehemmt. Es handelte sich also um einen T. mentagrophytes-Stamm, der sehr griseofulvinempfindlich war.

Das Untersuchungsmaterial, welches *nach 10tägiger Griseofulvinbehandlung* von den Kindern gewonnen wurde, war auch noch pilzhaltig. Aus ihm entwickelte sich auf der Kontrollkultur ein normales Pilzwachstum. Bis zur Nährbodenkonzentration von 0,5 µg/ml bildet der Dermatophyt ein Mycel mit schweren morphologischen Störungen. Bei höheren Griseofulvinkonzentrationen sahen wir kein Wachstum mehr.

Nach 18tägiger Griseofulvintherapie erhielten wir nur noch sterile Kulturen. Aus Haaren und Kopfschuppen konnte T. mentagrophytes nicht mehr gezüchtet werden.

IV. Diskussion und Ergebnisse

Eine verminderte Griseofulvinempfindlichkeit von Dermatophyten wurde unseres Wissens bisher nur bei einem von *Jadassohn* (134) gefundenen Trichophyton quinckeanum-Stamm in vivo, sowie nach experimenteller Adaptation durch Kultivierung auf griseofulvinhaltigen Nährböden (26, 43, 97, 118) oder durch Passagen über griseofulvinbehandelte Versuchstiere (55, 72, 117, 132) nachgewiesen.

Untersuchungen an Dermatophytenstämmen, die in vitro an Griseofulvin adaptiert waren (26, 43, 97, 118), haben gezeigt, daß in den meisten Fällen ein oder zwei Passagen über griseofulvinfreie Nährböden genügen, um die Griseofulvinempfindlichkeit wieder herzustellen. Aus diesem Grund ist zu vermuten, daß eine in vivo erworbene Adaptation der Dermatophyten an Griseofulvin ebenfalls verloren geht, wenn der Pilz im Verlauf der Isolierung und Weiterzüchtung zur Reinkultur mehrere Passagen auf griseofulvinfreien Nährmedien durchläuft.

Diese Überlegung könnte eine Erklärung für die Beobachtung darstellen, daß zwar in vitro eine Griseofulvinadaptation der Dermatophyten sehr leicht zu erreichen ist, daß jedoch bei Untersuchungen von griseofulvinbehandelten Patienten eine Griseofulvinresistenz der Dermatophyten praktisch niemals beobachtet wird.

Aus diesem Grund mußten wir bei unseren Untersuchungen griseofulvinfreie Passagen vermeiden und auf eine Reinzüchtung der Dermatophyten verzichten. Wir erreichten das, indem pilzverdächtiges Untersuchungsmaterial direkt auf Objektträgerkulturen überimpft wurde. Die hierbei verwendeten Agarblöcke enthielten Griseofulvin in abgestuften Konzentrationen von 0,25 bis 6,0 µg/ml.

In den üblichen Routinekulturen, bei denen Kimmig-Test-Agar in Reagenzgläsern verwendet wird, wird aus dem gleichen Untersuchungsmaterial ein wesentlich höherer Prozentsatz von Dermatophyten isoliert als in der von uns angelegten Untersuchungsreihe auf Objektträgerkulturen. Für diese Diskrepanz bieten sich verschiedene Erklärungen an.

Einmal wurde für unsere Untersuchungen jeweils nur das Restmaterial zur Verfügung gestellt, das nach Anlegen der Routinekultur übrig geblieben war. Möglicherweise enthielt dieses Restmaterial nur noch wenige Dermatophyten und war durch Begleitkeime wie Schimmelpilzsporen stärker verunreinigt.

Zum Zweiten besteht die Möglichkeit, daß die Objektträgerkultur für das Wachstum der Dermatophyten ungünstigere Bedingungen gewährt als die Primär-

kultur im Teströhrchen. Dafür spricht auch die Wachstumsverzögerung gegenüber den Routinekulturen auf den griseofulvinfreien Nährböden unserer Versuchsreihen. Diese Verzögerung bestand nicht nur in einer Verlängerung der Latenzphase durch die erschwerte Adaptation an das neue Nährmilieu, sondern war auch durch die verlängerte exponentielle Wachstumsphase bedingt. Von der Griseofulvinkonzentration wird die Auskeimungszeit nicht beeinflußt.

Bei unseren Untersuchungen sahen wir, daß ein Zusammenhang zwischen den mikromorphologischen Mycelveränderungen der Dermatophyten und der Griseofulvinkonzentration im Nährboden besteht. Diese Mycelveränderungen waren auch abhängig von der Einwirkungsdauer des Antibiotikums und der untersuchten Pilzart. Unsere Beobachtungen stimmen in etwa mit *Buch* (26) überein, die die Griseofulvinempfindlichkeit von Dermatophyten aus Reinkulturen untersuchte. Wir fanden die folgenden durch Griseofulvin verursachten konzentrationsabhängigen mikromorphologischen Mycelveränderungen:

den „curling effect"
Hemmung des Hyphenlängenwachstums
ballonartige Auftreibungen der Hyphenenden
Hyphenverknäuelungen
Cytoplasmaaustritte
Wachstumsstillstand
Mycelauflösungen

Diese morphologischen Veränderungen hatten andere Autoren auch feststellen können (3, 4, 20, 65, 76, 77, 113).

Die genannten Schädigungen können als konzentrationsabhängige Griseofulvin-Effekte aufgefaßt werden. Sie müssen aber nicht in der gleichen Reihenfolge auftreten. Wie *Buch* (26) konnten wir nämlich feststellen, daß bei einzelnen Dermatophyten gelegentlich Veränderungen wie der „curling effect" und Auftreibungen der Hyphenenden gleichzeitig und in der gleichen Konzentrationsstufe auftraten.

Den von vielen Autoren (4, 20, 113) als häufigste Griseofulvinveränderung bezeichneten „curling effect", ebenso eine Hemmung des Längenwachstums konnten auch wir bei allen untersuchten Dermatophyten in dem Konzentrationsbereich von 0,25 bis 6,0 µg/ml feststellen. In den höchsten Konzentrationen allerdings nur dann, wenn das Mycel nicht zu sehr geschädigt war, um noch zu einer Länge auszuwachsen, die eine lockenartige Verdrehung möglich machte.

Auch die weiteren mikromorphologischen Veränderungen stimmen mit den Beobachtungen anderer Autoren (77, 113) überein. Ballonartig aufgetriebene Hyphenenden, Hyphenverknäuelungen und Cytoplasmaaustritte sahen wir überwiegend bei Konzentrationen von 1,0 bis 6,0 µg/ml. Allerdings traten solche Griseofulvinwirkungen vereinzelt auch bei der Konzentration von 0,25 µg/ml auf.

Wir gewannen den Eindruck, daß die aus dem Direktmaterial auskeimenden Hyphen generell gegenüber Griseofulvin empfindlicher sind als die aus Subkulturen.

Außerdem fiel uns auf, daß bei zwei Dermatophyten der Art T. rubrum neben den Hyphen mit lockenartiger Verdrehung auch Hyphen ohne „curling effect" wuchsen. Das Längenwachstum dieser Hyphen war allerdings ebenso wie das der gelockten stark gehemmt.

Die Ausbildungen von Luftmycelien konnten wir im Bereich niedriger Griseofulvinkonzentrationen (0,25, 0,5 µg/ml) auch bei den Dermatophyten aus dem Direktmaterial beobachten, und zwar bei allen drei Pilzarten (T. rubrum, T. mentagrophytes und E. floccosum), die aus unserem Patientenmaterial wuchsen. Wie auch von anderen Autoren (1, 3, 17, 20, 26, 62) beschrieben worden ist, zeigte dieses Luftmycel ein völlig normales Wachstum. Griseofulvin kann also nur das vegetative Mycel, mit dem es im Nährboden direkten Kontakt hat, schädigen. Das Luftmycel bleibt dabei weitgehend unbeeinflußt.

Die Dermatophyten die uns nach den Wachstumsergebnissen auf der Griseofulvinverdünnungsreihe weniger griseofulvinempfindlich zu sein schienen, erwiesen sich nach dem von *Dittmar* (35) angegebenen Verfahren nicht als griseofulvinadaptiert beziehungsweise ihr Wachstum war wegen der nicht auszuschließenden Verunreinigung schwer zu beurteilen. Dagegen wuchs ein T. mentagrophytes-Stamm zu einer von *Dittmar* als vermindert griseofulvinempfindlich bezeichneten Wachstumsform aus, der auf unserer Griseofulvinreihe gegen das Antibiotikum sehr empfindlich reagiert hatte. Eine Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten war nicht erkennbar.

Für eine endgültige Bewertung ob ein Dermatophyt resistent geworden ist, sollten deshalb zwei getrennte Untersuchungsmethoden benutzt werden.

V. Zusammenfassung

Seit der Einführung des Griseofulvins in die Behandlung der durch Dermatophyten hervorgerufenen Mykosen wurde eine Griseofulvinresistenz der Dermatophyten im Verlauf der Therapie immer wieder erwogen.

Um auf Passagen über griseofulvinfreie Nährböden zur Reinzüchtung der Pilze vor der üblichen Resistenztestung in vitro verzichten zu können, bei denen eine reversible Adaptation der Dermatophyten griseofulvinbehandelter Patienten an das Antibiotikum wieder verloren gehen könnte, entwickelten wir eine direkte Testmethode.

Wir untersuchten dabei das direkt aus dem Untersuchungsmaterial (Hautschuppen, Nagelmaterial oder Haare) von 172 Patienten auskeimende Mycel lichtmikroskopisch auf Objektträgerkulturen in den ersten Tagen des Wachstums. Dabei gingen wir methodisch so vor, daß das Patientenmaterial gut zerkleinert auf Agarblöckchen einer Griseofulvinverdünnungsreihe, also auf Nährmedien mit verschiedenen Griseofulvinkonzentrationen geimpft wurde. Die Agarblöckchen wurden mit Deckgläsern bedeckt und auf Objektträgern in sterilen feuchten Kammern aufbewahrt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren, von denen Untersuchungen an Reinkulturen durchgeführt wurden, fanden wir die folgenden mikroskopisch sichtbaren Griseofulvinschädigungen auf unseren Objektträgerkulturen:

1. Keimungsverzögerung und Hemmung des Längenwachstums
2. den „curling effect"
3. blasige Auftreibungen der Hyphenenden
4. Cytoplasmaaustritte
5. Wachstumsstillstand
6. Mycelauflösungen

Diese morphologischen Veränderungen wurden bei unterschiedlichen Griseofulvinkonzentrationen (0,25—6,0 µg/ml) beobachtet. Betrachtet man niedrige, mittlere und höhere Konzentrationen, so lassen sich bei der Mehrzahl der Pilze charakteristische morphologische Abweichungen im Mycel feststellen.

So konnten wir bei der Griseofulvinkonzentration von 0,25 µg/ml im Nährboden regelmäßig einen „curling effect" beobachten, wenn überhaupt ein Wachstum stattfand.

Bei der Konzentration von 1,0 µg/ml waren außer dem „curling effect" auch immer noch Hyphenverstümmelungen und bei 6,0 µg/ml war nur noch ausnahmsweise ein Wachstum mit schwersten Störungen des Mycels zu sehen.

Die Individualität der Dermatophyten blieb auch bei dieser neuen Methode zur Resistenztestung erhalten. Wir züchteten aus dem Patientenmaterial drei Pilzarten: Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes und Epidermophyton floccosum. E. floccosum stellte das Wachstum auf griseofulvinhaltigen Nährböden früher ein als die beiden anderen Arten, während T. mentagrophytes fast in allen Konzentrationsstufen im Gegensatz zu T. rubrum gleichzeitig wuchs.

Die Dermatophyten zeigten bei unseren Untersuchungen keine Abweichung in ihrem Verhalten gegenüber dem in den Routinekulturen, so daß auf eine Reinzüchtung und somit auf griseofulvinfreie Passagen vor der Resistenztestung verzichtet werden könnte, wenn ausreichende Mengen homogenisierten Materials überimpft werden.

Nachteilig bei der Verwendung von Direktmaterial wirkt sich dagegen die Verunreinigung durch Begleitkeime wie Hefen und vor allem Schimmelpilzsporen aus.

Es müßte durchaus möglich sein, mit dieser Methode eine in vivo eingetretene Adaptation eines Dermatophyten zu erkennen. Da unter den von uns untersuchten 172 Patienten kein Fall war, bei dem klinisch der Verdacht einer Griseofulvinresistenz bestand, gelang es nicht, die Resistenz eines Dermatophyten in vivo gegen das Antibiotikum Griseofulvin aufzudecken. Es bleibt allerdings zu überprüfen, inwieweit ein, wenn auch gestörtes Wachstum bei einer Griseofulvinkonzentration von 6,0 µg/ml nicht doch schon eine geringe Empfindlichkeit des Erregers gegenüber Griseofulvin darstellt.

Lebenslauf

Am 1. 3. 1944 wurde ich in Würzburg als Tochter von Dr. med. Lothar Dyck und Dr. med. Maja Dyck, geb. Rosenberger geboren. Nach der Grundschule in Roßla a. Harz und in Sangerhausen (Thüringen) besuchte ich von 1955 bis zum Abitur 1964 das Humanistische Gymnasium in Aschaffenburg.

1964 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Medizinstudium und legte dort nach dem Physikum 1967 am 17. 2. 1971 das medizinische Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistentin arbeitete ich auf der chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Priwall in Lübeck-Travemünde, an der Städt. Kinderklinik in Aschaffenburg und bin jetzt auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Schotten/Oberhessen tätig.

Literaturverzeichnis

(1) *Abbot, M. T. J.*, and *J. F. Grove:* Uptake and translocation of griseofulvin. Exp. cell. res. *17*, 103—105 (1959).

(2) *Albrecht, M.:* Einwirkung von Griseofulvin auf Kulturen von embryonalen Fibroblasten und menschlichem Knochenmark. Arzneimittelforsch. *12*, 282—285 (1962).

(3) *Aytoun, R. S. C.:* The effects of griseofulvin on certain phytopathogenic fungi. Ann. Botany N. S. Vol. *20*, 297—305 (1956).

(4) *Aytoun, R. S. C., E. Napier, A. H. Campell* and *D. A. L. Seiler:* Mycological aspects of action of griseofulvin against dermatophytes. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 650—656 (1960).

(5) *Barich, L. L., J. Schwarz, D. J. Barich* and *M. G. Horowitz:* Induction on reversibility of griseofulvin induced hepatomegaly and hepatitis in mice. Clin. Med. *71*, 91—98 (1964).

(6) *Barich, L. L., T. Nakai, J. Schwarz* and *J. Barich:* Tumour-promoting effects of excessively large dosis of oral griseofulvin on tumours induced in mice by methylcholantene. Nature (Lond.) *187*, 4734, 335—336 (1960).

(7) *Barnes, M. J.*, and *B. Boothroyd:* The metabolism of griseofulvin in mammals. Biochem. J. *78*, 41—43 (1961).

(8) *Bedford, C. D., B. Busfield, K. J. Child, J. Mac Gregor, F. Sutherland* and *E. G. Tomich:* Studies on the biological deposition of griseofulvin an oral antifungal agent. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 735—745 (1960).

(9) *Bedford, C., K. J. Child* and *E. G. Tomich:* Spectrophotofluorometric assay of griseofulvin Nature (Lond.) *184*, 364—365 (1959).

(10) *Berman, A.*, and *Franklin, R. L.:* Precipitation on acute intermittent porphyria by griseofulvin therapy. J. A. M. A. *192*, 1005—1007 (1965).

(11) *Bessone, L.:* Ginecomastia e iperpigmentazioni successive a somministrazione di Griseofulvina rilievi clinici e radiologici. Atti. Soc. ital. Derm. Sif. *40*, 440—446 (1965).

(12) *Biggio, P., G. L. Gessa*, e *P. Pinetti:* Azione protettiva della griseofulvina sulla necrosi-ischemica da ergotamina della coda del ratto. Boll. Soc. ital. Biol. spec. *40*, 785—786 (1964).

(13) *Blaich:* Erwähnt bei *H. Walther:* Zur Griseofulvintherapie der Dermatomykosen. Die Griseofulvintherapie der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 82—84.

(14) *Blank, H., D. Taplin, F. J. Roth jr.:* Electron microscopic observations on the effects of griseofulvin of dermatophytes.
A. M. A. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 667—680 (1960).

(15) *Blank, H.:* Antifungal and other effects of griseofulvin.
Amer. J. Med. *39*, 831—838 (1965).

(16) *Blank, H.*, and *F. J. Roth:* The treatment of dermatomycoses with orally administered griseofulvin. Arch. Derm. Syph. *79*, 259—266 (1959).

(17) *Boothroyd, B., E. J. Napier* and *G. A. Sommerfield:* The demethylation of griseofulvin by fungi. Biochem. J. *80*, 34—37 (1961).

(18) *Böhme, H.*, und *H. Ziegler:* Untersuchungen über die Wirkung von Griseofulvin auf Mikrosporum canis. Mykosen *3*, 57—69 (1960).

(19) *Brian, P. W.:* Controll of fungal diseases of plants with griseofulvin.
Trans. St. John's Hosp. derm. Soc. *45*, 4—6 (1960).

(20) *Brian, P. W.:* Studies on the biological activity of griseofulvin.
Ann. Botany N. S. Vol. *83*, 59—77 (1949).

(21) *Brian, P. W., P. J. Curtis* and *H. G. Hemming:* A substance causing abnormal development of fungal hyphae produces by penicillium janczewskii Zal.
1. Biological assay production and isolation of „curling factor". Trans. Brit. Mycol. Soc. *29*, 173—187 (1946).

(22) *Brian, P. W., P. J. Curtis* and *H. G. Hemming:* A substance causing abnormal development of fungal hyphae produces by penicillium janczewskii Zal. 3. Identy of „curling factor" with griseofulvin. Trans. Brit. Mycol. Soc. *32*, 30—33 (1964).

(23) *Brian, P. W., P. J. Curtis* and *H. G. Hemming:* Production of griseofulvin by penicillium raistrickii. Brit. Mycol. Trans. *38*, 305—308 (1955).

(24) *Brian, P. W., J. M. Wright* and *A. M. Way:* Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganismus by plants. Nature (Lond.) *167*, 347—349 (1951).

(25) *Brossi, A., M. Baumann, M. Gerecke* und *E. Kyburz:* Syntheseversuche in der Griseofulvinreihe vorl. Mitt.: Totalsynthese von Griseofulvin. Helv. Chem. Acta *43*, 1444—1447 (1960).

(26) *Buch, H.:* Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Griseofulvinempfindlichkeit und -resistenz der Dermatophyten. Inaug.-Diss. Marburg (1969).

(27) *Busfield, D., K. J. Child, R. M. Atkinson* and *E. G. Tomich:* An effect of phenobarbitone on blood levels of griseofulvin in man. Lancet *2*, 1042—1043 (1963).

(28) *Busfield, D., K. J. Child*, and *E. G. Tomich:* An effect of phenobarbitone on griseofulvin metabolism in the rat. Brit. J. Pharmacol. *22*, 137—142 (1964).

(29) *Busfield, D., K. J. Child, B. Basil* and *E. G. Tomich:* The influence of sex on the catabolism of griseofulvin. J. Pharm. (Lond.) *12*, 539—543 (1960).

(30) *Cohen, A., J. Goldmann, R. Daniels* and *W. Kanenson:* Treatment of shoulder-hand syndroms with griseofulvin. J. A. M. A. *173*, 542—543 (1960).

(31) *Copper, D.:* Erwähnt bei *Brian, P. W.* Presidential adress. Griseofulvin.
Brit. Mycol. Soc. Trans. *43:* 1—13 (1960).

(32) *Crounse, R. G.:* Human pharmacology of griseofulvin: The effect of fat intake on gastrointestinal absorption. J. Invest. Derm. *37*, 529—533 (1961).

(33) *De Matteis, F.*, and *C. Rimington:* Disturbance of porphyrin metabolism caused by griseofulvin in mice. Brit. J. Derm. *75*, 91—104 (1963).

(34) *De Pasquale, N. P., J. W. Burks* and *G. E. Burch:* The treatment of angina pectoris with griseofulvin. Preliminary communication. J. A. M. A. *184*, 421—422 (1963).

(35) *Dittmar, W.:* Ein vereinfachtes Verfahren zur schnellen invitro-Bestimmung der Griseofulvin-Resistenz von Dermatophyten. 7. Wiss. Tagung der Deutschspr. Mycol. Ges. Krefeld 21. 6.—22. 6. 1969.

(36) *El-Nakeeb, M. A., W. L. Mc Lellan jr.* and *J. O. Lampen:* Antibiotic action of griseofulvin on dermatophytes. J. Bact. *89*, 557—563 (1965).

(37) *Epstein, W. L.*, and *M. A. Larson:* Griseofulvinpotentiation of colchizine toxicity. J. Invest. Derm. (Baltimore) *36*, 5—6 (1961).

(38) *Ettig, B.:* Griseofulvin und Trichomycin, zwei perorale Antimykotika zur Therapie mykotischer Infektionen. Forsch. Fortschr. dtsch. wiss. *37*, 262—265 (1963).

(39) *Faustova, A. J.:* On the problem of nonspecific reactivity of the skin in patients with microsporosis and trichophytosis treated with griseofulvin. Vestn. Derm. Vener. (Moskau) *41*, Nr. 12, 49—51 (1967).

(40) *Fegeler, F.*, und *G. Forck:* Nebenwirkungen der Griseofulvintherapie. Die griseofulvinbehandlung der Dematomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 92—99.

(41) *Fegeler, F.:* Zum heutigen Erscheinungsbild der Dermatomykosen und ihren Erregern. Archiv. klin. und exp. Derm. *213*, 688—695 (1961).

(42) *Fischer, E.:* Die experimentell-pharmakologischen Grundlagen der Griseofulvinbehandlung. Dermatologica (Basel) *123*, 153—158 (1961).

(43) *Fisher, B. K., J. G. Smith jr., R. G. Crounse, F. J. Roth jr.* and *H. Blank:* Verrucous epidermophytosis, its response and resistance to griseofulvin. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *84*, 375—380 (1961).

(44) *Forck, G.*, und *F. Fegeler:* Spasmen der peripheren arteriellen Gefäße bei Nagelpilzerkrankungen und ihre Lösung durch Griseofulvin. Zur Methodik der Darstellung des peripheren Volumenpulses. Münch. med. Wschr. *104*, 2342—2345 (1962).

(45) *Frank, I., K. Steiner, J. Kaufmann* and *J. Chiaramonte:* A clinical evaluation on toxicity study to griseofulvin. N. I. St. J. Med. *60*, 1230—1233 (1960).

(46) *Frey, J. R., A. Brossi, H. Geleick* und *H. J. Scholer:* Stereospezifität der Griseofulvinwirkung. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 10—13.

(47) *Frey, J. R.*, und *H. Geleick:* Zur Wirkung von Griseofulvin auf die experimentelle Trichophytie des Meerschweinchens. Dermatologica (Basel) *119*, 132—148 (1959).

(48) *Friedrich, E., E. Brandt, E. Borchardt, K. und J. Krause:* Zur lokalen Behandlung oberflächlicher Dermatophytien mit Gricin. Hautarzt *17*, 368—370 (1966).

(49) *Gentles, J. C.:* Pharmacological and biological aspects of griseofulvin. Arch. klin. exp. Derm. *213*, 685—688 (1960).

(50) *Gentles, J. C.:* Experimental ringworm in guinea pigs: Oral treatment with griseofulvin. Nature (London) *182*, 476—477 (1958).

(51) *Gentles, J. C., M. J. Barnes and K. H. Fantes:* Presence of griseofulvin in hair of guinea pigs after oral administration. Nature (London) *183*, 256—257 (1959).

(52) *Goldmann, L., A. Beyer and J. Schwarz:* Absence of local cytotoxic change in man from griseofulvin. Nature (London) *187*, 4734: 335—335 (1960).

(53) *Götz, H.:* Griseofulvin, ein orales, die bisherige Dermatomykose-Therapie revolutionierendes Antibiotikum. Med. Klinik *54*, 2162—2166 (1959).

(54) *Götz, H.:* Therapie der Dermatomykosen. Nebenwirkungen der Griseofulvintherapie. Jadassohn, Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Ergänzungswerk 4/3, bearbeitet von H. Götz, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962. Zur Frage der Entwicklung resistenter Pilzstämme 391—392.

(55) *Götz, H.:* Therapie der Dermatomykosen. Zur Frage der Entwicklung resistenter Pilzstämme. Jadassohn, Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Ergänzungswerk 4/3, bearbeitet von H. Götz, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 392—393.

(56) *Götz, H.:* Experimentelle und klinische Beobachtungen bei der Behandlung der Tinea manum, peduum, corporis und unguium mit Griseofulvin.
Hautarzt *10*, 539—547 (1959).

(57) *Götz, H., D. Hantschke* und *M. Valentovà:* Vergleich der Wirksamkeit von Colistin, Novobiocin und Actidion zu Dermatomycin bei der Züchtung von Dermatophyten aus Nagel- und Hautmaterial nach dem Einbettungsverfahren.
mykosen *12*, 17—22 (1969).

(58) *Greco, G. A., E. L. Moss jr.* and *E. J. Floey:* Observations on treatment of fungus infections of animals with griseofulvin. Antibiot. Ann. 1959—1960, 663—669.

(59) *Grimmer, H.:* Entschließung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft: Kontraindikationen der Griseofulvin-Therapie. mykosen *8*, 513 (1969).

(60) *Grimmer, H.:* Histologische Untersuchung bei Nagelmykosen (Nachweis vegetativer Pilzelemente und deren Bedeutung für die Griseofulvintherapie). Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen, Springer-Verlag, 1962, Berlin-Göttingen-Heidelberg 78—78.

(61) *Grimmer, H.:* Histopathologie der Onychomykose und ihre Bedeutung für die Griseofulvintherapie. Z. Haut- u. Geschl.-Kr. *28*, 365—376 (1960).

(62) *Grimmer, H.:* Griseofulvin. mykosen *3*, 124—136 (1960).

(63) *Grove, J. F., D. Ismay, J. Mc Millan, T. P. C. Mulholland* and *M. A. T. Rogers:* Communication to the editor. The structure of griseofulvin.
Chem. and Ind. 1951, 219—220.

(64) *Grove, J. F.* and *J. C. Mc Gowan:* Identy of griseofulvin and „curling factor". Nature (London) *160*, 4069, 574—574 (1947).

(65) *Heite, H. J.* und *D. Janke:* Griseofulvin. Dtsch. med. Wschr. *84*, 2202—2206 (1959).

(66) *Heite, H. J.:* Zur Pharmakologie des Griseofulvins. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 1—9.

(67) *Hewitt, J., P. Kaufmann* et *L. Jouffroy:* Effects locaux de la griséofulvine en pommade sur les dermatophyties cutaneeś. Bull. Soc. franc. Derm. Syph. *74*, 185—188 (1967).

(68) *Heymer, F.:* Untersuchungen über den Einfluß des Griseofulvins auf die Mitose bei Vicia faba L. Dtsch. med. Wschr. *85*, 438—439 (1960).

(69) *Hoffmann, K.:* Die Behandlung der Dermatomykosen mit Griseofulvin. Z. Militärmed. *7*, 101—103 (1966).

(70) *Hoffmann, V.:* Experimentelle Untersuchungen zur Früh-Diagnostik von Dermatophyten. Inaug-Diss. Hamburg (1964).

(71) *Ito, K.:* Dermatophytes sensitivity to griseofulvin. Bull. pharm. Res. Inst. (Osaka) *498*, 1—20 (1964).

(72) *Ito, K., M. Takeuchi* and *S. Tomomatsu:* Dermatophytes relatively resistant to griseofulvin. Bull. Pharm. Res. Inst. (Osaka) *29*, 10—15 (1960).

(73) *Immel, L.* und *P. Schmidt:* Klassische Fälle erfolgreicher Griseofulvinbehandlung. mykosen *11*, 1—8 (1968).

(74) *Janke, D.:* Zur Griseofulvinbehandlung in der Praxis. mykosen *9*, 221—222 (1966).

(75) *Jefferys, E. G., P. W. Brian, H. G. Hemming* and *D. Love:* Antibiotic production by the microfungi of acid heath soils. J. gen. Microbiol. (London) *9*, 314—325 (1953).

(76) *Jung, H. D.* und *H. Gerhard:* Verhalten und Hemmung reduzierender Fermentsysteme unter Griseofulvineinwirkung bei verschiedenen Dermatophyten, facultiv pathogenen Myceten, Hefen und Saprophyten. Derm. Wschr. *148*, 257—264 (1963).

(77) *Jung, H. D.* und *H. Gerhard:* Die Einwirkung von Griseofulvin auf die Funktion reduzierender Fermente bei Dermatophyten und Saprophyten. Derm. Wschr. *148*, 310—318 (1963).

(78) *Kaplan, W.* and *L. Ajello:* Oral treatment of spontaneous ringworm in cats with griseofulvin. J. Am. Vet. M. A. *135*, 253—260 (1959).

(79) *Koch, H.:* Erfahrungen mit Griseofulvin in der Poliklinik. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 87—92.

(80) *Kyburz, E., H. Geleick, J. R. Frey* und *A. Brossi:* Syntheseversuche in der Griseofulvinreihe. 2. Mitt. Abwandlung im Ring C von Griseofulvin. Helv. chim. Acta *43*, 2083—2087 (1960).

(81) *Lamb, J. H., P. E. Jones, R. J. Morgan, M. A. Everett* and *J. N. Feurod jr.:* Further studies in light sensitive eruptions. Arch. Derm. Syph. *83*, 568—583 (1961).

(82) *Latapi, F.:* Griseofulvina, un neuvo antimicotico per via oral. Sem. med. Mex. *64*, 113—115 (1959).

(83) *Lauder, J. M.* and *J. G. O'Sullivan:* Ringworm in cattle, prevention and treatment with griseofulvin. Vet. Rec. *70*, 949—951 (1958).

(84) *Lenhart, K.:* The resistance of the dermatophytes to griseofulvin. Csl. Derm. *42*, 30—32 (1967).

(85) *Livingood, G. S., M. Brannen, R. L. Orders, J. B. Kopstein* and *J. W. Rebuck:* The effect of prolonged administration of griseofulvin on the liver, hematopoetic system and kidney. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 760—765 (1960).

(86) *Lochhead, A. C., J. H. Dagg* and *A. Goldberg:* Experimental griseofulvin porphyria in adult and foetal mice. Brit. J. Derm. *79*, 96—102 (1967).

(87) *Martin, A. R.:* The systemic and local treatment of experimental dermatophytosis with griseofulvin. J. invest. Derm. *32*, 525—528 (1959).

(88) *Mc Cuistion, C. H., M. Lawlis* and *B. B. Gonzales:* Human pharmacological studies with griseofulvin. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 766—768 (1960).

(89) *Mc Gowan, J. C.:* A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by penicillium janczewskii Zal. 2. Preliminary notes on the chemical and physical properties of „curling factor". Brit. Mycol. Soc. Trans. *29*, 188—193 (1946).

(90) *Mc Leod, J.* and *W. C. Nelson:* Griseofulvin and human spermatogenesis. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) *102*, 259—260 (1959).

(91) *Mc Leod, J.* and *W. C. Nelson:* Griseofulvin and human spermatogenesis. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 758—759 (1960).

(92) *Mc Nall, E. G.:* Biochemical studies on the metabolism of griseofulvin. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81*, 66—76 (1960).

(93) *Mc Nall,* E. G.: Metabolic studies on griseofulvin and its mechanism of action. Antibiotic. Ann. 1959—1960, 674—679.

(94) *Meara, N. H.:* Tinea capitis treated with griseofulvin. Brit. J. Derm. *72*, 169—172 (1960).

(95) *Meinhof, W.:* Ergebnisse der langfristigen Behandlung von Nagelmykosen mit Griseofulvin. Z. Haut- und Geschl.-Kr. *38:* 399—408 (1965).

(96) *Meinhof, W.:* Untersuchungen zum Nachweis einer Griseofulvin-Adaptation der Dermatophyten in vivo. 7. wiss. Tagung der Deutschspr. Mykol. Ges., Krefeld 21. 6. — 22. 6. 1969.

(97) *Michaelides, P., S. A. Rosenthal, M. B. Sulzberger* and *V. H. Witten:* Trichophyton tonsurans infection resistent to griseofulvin. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *83*, 988—990 (1961).

(98) *Napier, E. J., D. J. Turner* and *A. Rhodes:* The in vitro action of griseofulvin against pathogenic fungi of plants. Ann. Botany N.S. Vol. *20*, 461—466 (1956).

(99) *Nasemann, T.* und *H. J. Bandmann:* Allergische Exantheme als Komplikation bei der Griseofulvintherapie. Hautarzt *14*, 505—509 (1963).

(100) *Orrenius, S. J., S. B. Ericsson* and *L. Ernster:* Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolising enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. J. Cell. Biol. *25*, 672—692 (1965).

(101) *Oxford, A. E., H. Raistrick* and *P. Simonart:* Studies on the biochemistry of microorganisms. Griseofulvin $C_{17}H_{17}O_6Cl$, a metabolic product. Biochem. J. *33*, 240—248 (1939).

(102) *Paget, C. E.* and *A. L. Wilpole:* Some cytological effects of griseofulvin. Nature (London) *182*, 1320—1321 (1958).

(103) *Paschaud, J. M.:* Die Griseofulvinbehandlung der Nagelmykosen bei Bradyplasie der Nägel. Dermatologica (Basel) *123*, 159—163 (1961).

(104) *Pettker, K.* und *H. Rieth:* Mikrosporiebehandlung mit Griseofulvin bei einer Heimepidemie durch Mikrosporum Audouinii. Z. Haut- und Geschl.-Kr. *28*, 177—184 (1960).

(105) *Pinetti, P.:* The extra-antimycotic activities of griseofulvin. Ital. gen. Rev. Derm. *6*, Nr. 2, 7—16 (1965).

(106) *Pöhler, H.:* Behandlung von oberflächlichen Dermatomykosen mit Gricin-Salbe im doppelten Blindversuch. mykosen *11*, 665—671 (1969).

(107) *Polemann, G.:* Zur Diagnostik und Therapie der Onychomykosen. Med. Klinik *37*, 543—549 (1962).

(108) *Redecker, A. G., R. E. Sterling* and *N. S. Bronow:* Effect of griseofulvin acute intermittent porphyria. J.A.M.A. *188,* 460—468 (1964).

(109) *Richenberger, M.* und *H. Götz:* Zur Therapie der Tinea unguium mit Griseofulvin. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 68—71.

(110) *Riehl, G., K. Hekele* und *O. Lofferer:* Erfahrungen mit dem peroral wirksamen Antimycoticum Griseofulvin. Derm. Wschr. *141,* 161—171 (1960).

(111) *Riehl, G.:* Griseofulvin, ein peroral wirksames Antimycoticum. Hautarzt *10,* 136—136 (1959).

(112) *Rieth, H.:* Die Antimykotica. Jadassohn, Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Ergänzungswerk 5/1. Herausgegeben von J. Kimmig. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 1236—1245.

(113) *Rieth, H.:* In-vitro-Beobachtungen zur Wirkungsweise des Griseofulvins. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 18—24.

(114) *Rieth, H.:* Griseofulvin bei der Mikrosporie und der Trichophytie. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 40—52.

(115) *Rieth, H.:* Antimykotica unter besonderer Berücksichtigung des Griseofulvins. Hautarzt *12,* 193—200 und 242—249 (1961).

(116) *Robinson jr., H. M., R. C. V. Robinson, E. S. Bereston, L. I. Manchey* and *F. K. Bell:* Griseofulvin, clinical and experimental studies.
Arch. Derm. Syph. (Chikago) *81,* 66—76 (1960).

(117) *Rosenthal, S. A.* and *R. S. Wise:* Studies concerning the development of resistance of griseofulvin by dermatophytes. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81,* 684—689 (1960).

(118) *Roth, F. J. jr.:* Erwähnt bei Hildick-Smith, G. H. Blank and J. Sarkany. Relapse, resistant and failure of treatment with griseofulvin. Fungus Diseases and their Treatment, Little, Brown and Co. Boston 1964, 465—469.

(119) *Roth jr., F. J., B. Sallmann* and *H. Blank:* In vitro studies of the antifungal antibiotic griseofulvin. J. invest. Derm. *33,* 403—418 (1959).

(120) *Roth jr., F. J.* and *H. Blank:* The bioassay of griseofulvin in human stratum corneum. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81,* 662—666 (1960).

(121) *Rubin, A. A.:* Coronary vascular effects of griseofulvin.
J.A.M.A. *185,* 971—972 (1963).

(122) *Schäfer, U., W. Schöldgern* und *G. Stüttgen:* Der Einfluß einer langfristigen Griseofulvintherapie auf Serummilchsäuredehydrogenase, Serumtransaminase und Bluteiweiße. Z. Haut- und Geschl.-Kr. *32,* 76—81 (1962).

(123) *Schirren, C.:* Tierexperimentelle Untersuchungen zur Griseofulvinwirkung auf die Spermiogenese der Ratte. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 30—35.

(124) *Schwarz, J.* and *J. K. Loutzenhiser:* Laboratory experiences with griseofulvin.
Arch. Derm. Syph. (Chicago) *81,* 694—699 (1960).

(125) *Slonim, R. R., D. S. Howell* and *N. Z. Brown jr.:* Influence of griseofulvin upon acute gouty arthritis. Arthrit. Rheumat. *5,* 397—399 (1962).

(126) *Stanka, P.* und *Th. Nasemann:* Mitosehemmung durch Griseofulvin in Hela-Zell-Kulturen. Hautarzt *12,* 468—469 (1961).

(127) *Steinberg, T. H.* und *E. Mc Nall:* Griseofulvin, seine biologische Chemie und Aktivität. Arch. klin. exp. Derm. *213,* 674—680 (1960).

(128) *Sturde, H. C.:* Die heutige Beurteilung der Griseofulvin-Therapie. Z. Haut- und Geschl.-Kr. *41,* 473—474 (1960).

(129) *Sturm, W.:* Ergebnisse bei äußerlicher Gricinbehandlung von Dermatophyten. Dermat. Wschr. *4,* 73—80 (1968).

(130) *Tappeiner, J.:* Griseofulvin, ein peroral wirksames Antimykotikum bei Trichophytia superficialis capillitii et corporis. Derm. Wschr. *140,* 744—746 (1959).

(131) *Teller, H.* und *F. Schönknecht:* Beitrag zur Griseofulvin-Therapie der Mikrosporie. Z. Haut- und Gschl.-Kr. *28,* 160—165 (1960).

(132) *Thurner, J.:* In-vitro-Studien über Griseofulvin. mykosen *5,* 54—62 (1962).

(133) *Vanbreuseghem, R.* und *S. Rosenthal:* Griseofulvinaufnahme durch die Nägel. Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, 55—64.

(134) *Vidmar-Cvetanovic, B.* und *W. Jadassohn:* Experimentelles zur Griseofulvinresistenz. II. Untersuchungen an einem Trichophyton quinckeanum-Stamm. Hautarzt *18,* 346—437 (1967).

(135) *Weston-Hurst, E.* and *G. E. Paget:* Protoporphyrin, cirrhosis and hepatomata in the livers, of mice given griseofulvin. Brit. J. Derm. *75,* 105—112 (1963).

(136) *Williams, D. J., R. H. Marten* and *I. Sarkany:* Oral treatment of ringworm with griseofulvin. Lancet 2, 1211—1213 (1958).

(137) *Williams, D. J., R. H. Marten* and *I. Sarkany:* Phytotoxic effects of some antibiotics. Ann. Botan. *15,* 493—501 (1951).

(138) *Ziprkowski, L., A. Krakowski, M. Schewach-Millet* and *S. Btesh:* Griseofulvin in the mass treatmant of tinea capitis. Bull. Wld. Hlth. Org. *23,* 803—810 (1960).